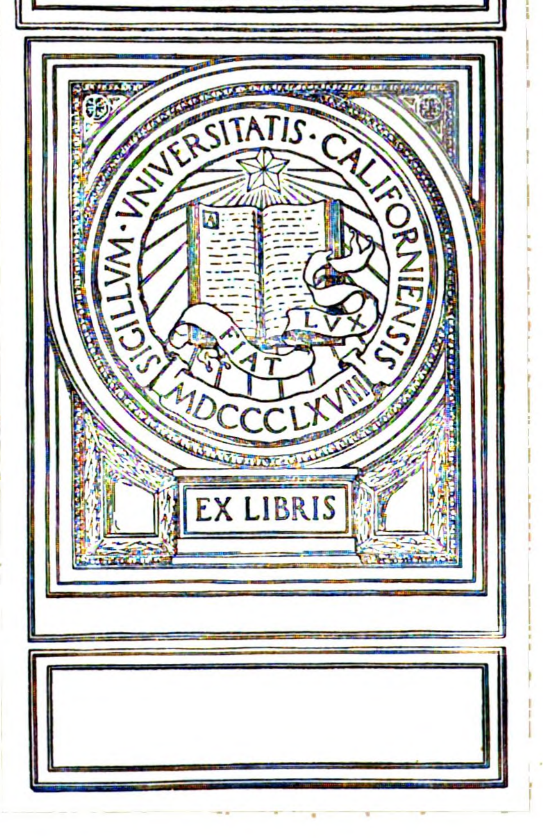
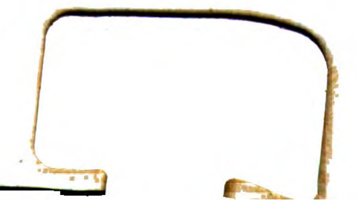
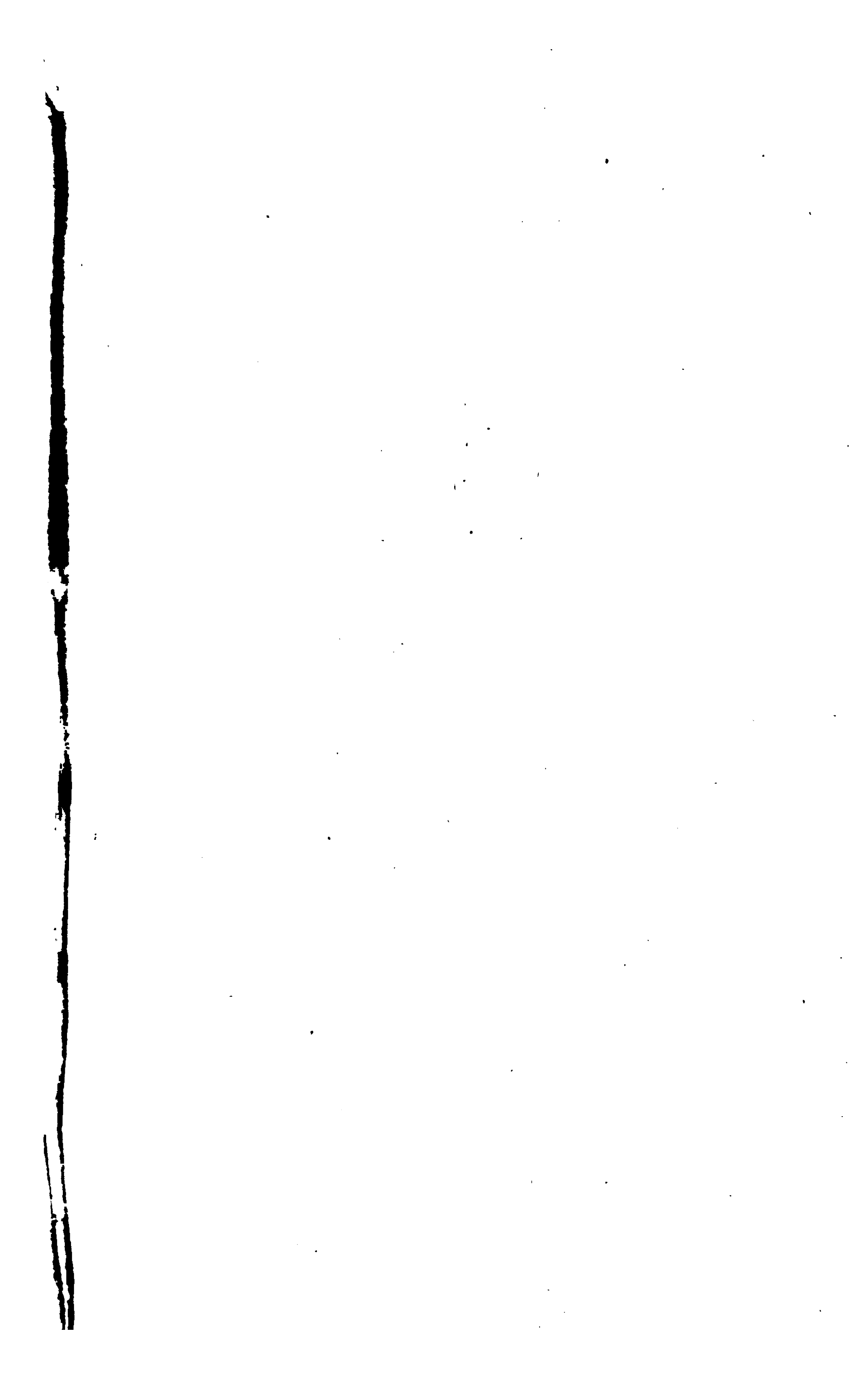
PAGE NOT AVAILABLE









Biochemische Zeitschrift

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertsiebenundsechzigster Band



Berlin

Verlag von Julius Springer

1926

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.

Über die Milchsäurebildung bei der Totenstarre glatter Muskeln. I.

Von

Ernst Mangold und **Constanze Schmitt-Krahmer.**

(Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft.)

(Aus dem tierphysiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Berlin.)

(Eingegangen am 6. Oktober 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die *Milchsäurebildung*, auf deren früher ungeahnte Bedeutung in der Physiologie unlängst von berufenster Seite[1]) eingehend hingewiesen wurde, steht besonders in der Lehre von der Kontraktion und Energetik des Muskels zurzeit im Mittelpunkt des Interesses. Sie scheint überhaupt zu den allgemeinen Grundeigenschaften der tierischen Zellen zu gehören[2]). Über die schon lange angenommene Beziehung zwischen Milchsäurebildung, Kontraktion und Totenstarre des Muskels ist mehrfach zusammenfassend von *Fürth*[3]), über letztere auch von *Winterstein*[4]) berichtet worden. In allen hier entstehenden Fragen hat die experimentelle Forschung fast ausschließlich die *quergestreifte Muskulatur* berücksichtigt, die glatte aber vernachlässigt. Angesichts ihrer Bedeutung für die Funktion der vegetativen Organe, deren Innervation bereits viel eingehender erforscht wurde, gebührt aber auch den *glatten Muskeln* ein erhöhtes Interesse. Das Studium ihres Mechanismus und Chemismus wird auch, gerade durch ihre funktionelle Verschiedenheit von den quergestreiften Muskeln, für die Physiologie der letzteren manche neuen Gesichtspunkte liefern.

---

[1]) *C. Neuberg* und *Kobel*, Zeitschr. f. angew. Chem. **38**, 761, 1925.

[2]) Vgl. *Flury*, diese Zeitschr. **146**, 297, 1924; *Schmitz* und *Chrometzka*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **144**, 196, 1925.

[3]) *von Fürth*, Ergebn. d. Physiol. **17**, 389, 1919; Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **4**, 303, 1904; ebendaselbst, 2. Aufl., **8**, 56, 1924.

[4]) *H. Winterstein*, Deutsch. Zeitschr. f. d. ges. gerichtl. Med. **2**, 1, 1923.

Dies hat sich durch Arbeiten der letzten Jahre auf dem Gebiete der Totenstarre ergeben[1]). Bis dahin hatte die schon seit *Kühne*, *Heidenhain* und *Hermann* bekannte *Totenstarre der glatten Muskulatur*, über die gleichzeitig zusammenfassend berichtet wird[2]), wenig Beachtung gefunden. Den Arbeiten über ihren Mechanismus schließt sich nun die folgende chemische Untersuchung an.

Es handelt sich um die Frage, ob auch bei der glatten Muskulatur im Verlauf der Totenstarre eine *Milchsäurebildung* stattfindet, welche zeitlichen Beziehungen zwischen derselben und der Entwicklung der mechanischen Veränderungen des glatten Muskels bestehen und ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen beiden im Sinne einer „Verkürzungssubstanz" angenommen werden darf.

Der Milchsäure, die sich im Muskel bei der funktionellen Tätigkeit wie bei verschiedenen Starreformen anhäuft, wird bekanntlich eine dominierende Rolle als Verkürzungssubstanz zugeschrieben[3]). Doch wird noch die Frage erörtert, ob sie bei allen echten Kontrakturen die mechanische Zustandsänderung bedingt, wie *Meyerhof*[4]) mit Hinweis darauf annimmt, daß eine gesteigerte Milchsäurebildung außer für Toten- und Wärmestarre auch für die $CHCl_3$-, Alkohol-, Coffein- und NaOH-Starre festgestellt wurde, oder ob ihr doch nicht bei allen Kontrakturen diese Bedeutung zukommt [*Riesser*[5])]. *Meyerhof*[4]) denkt für die Totenstarre daran, daß die anaerob im Muskel angehäufte Milchsäure ihrerseits die dann mit stark gesteigerter Milchsäurebildung einhergehende Kontraktur hervorrufe.

Jedenfalls aber handelt es sich, wie *Salkowski* es treffend charakterisiert, um die *Fortsetzung eines vitalen Vorganges*: „Der Muskel bildet nicht Milchsäure, weil er stirbt, sondern weil er lebt. Die Bildung von Milchsäure wäre demnach kein Absterbe-, sondern ein Lebensphänomen[6])".

Der für die quergestreiften Muskeln schon lange nachgewiesene enge *Zusammenhang zwischen Milchsäurebildung, Kontraktion und Starre*[7]) *ist für die glatte Muskulatur* bisher noch nicht geprüft worden. Selbst ihre Fähigkeit zur Milchsäurebildung ist nicht einheitlich beurteilt worden.

Während zuerst *Lehmann*[8]) am Schweinemagen und der Rinderaorta das Auftreten saurer Reaktion und auch die Gegenwart von Milchsäure im Safte glatter Muskeln[9]) nachwies, konnte *Du Bois Reymond*[10]) im Muskelmagen von Huhn und Taube vom frischen Zustand an bis zur Fäulnis niemals eine saure Reaktion finden; er hielt aber doch eine Milchsäurebildung für möglich und erklärte ihren Nachweis durch *Siegmund*[11]) im

---

[1]) Vgl. *E. Mangold*, Die Naturwissenschaften 1922, Nr. 41.
[2]) *Derselbe*, Ergebn. d. Physiol. 25.
[3]) *von Fürth*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., 8, 88, 1924.
[4]) *Meyerhof*, Ergebn. d. Physiol. 22, 328, 1923.
[5]) *Riesser*, Klin. Wochenschr. 3, 1060, 1924.
[6]) Zitiert nach *Neuberg* und *Kobel*, l. c.
[7]) Näheres siehe *von Fürth*, Ergebn. d. Physiol. 17, 453, 1919.
[8]) *Lehmann*, Lehrb. d. physiol. Chem. 3, 72, 98, 1852; 3, 62, 1853.
[9]) *Derselbe*, ebendaselbst 1, 107, 1853.
[10]) *Du Bois Reymond*, De fibrae muscularis reactione. Berol. 1859; Monatsber. d. Berl. Akad. d. Wiss. 1859.
[11]) *Siegmund*, Verh. d. phys. med. Ges. Würzburg 3, 50, 1852.

menschlichen puerperalen Uterus, im Sinne seiner eigenen Erfahrungen an der quergestreiften Muskulatur, durch die vorangegangenen Kontraktionen des Uterus.

Dieser Nachweis der Milchsäurebildung wurde später auch von *Hirsch*[1]) an operativ entfernten menschlichen Uteri und Fibromyomen erbracht, wobei sich zugleich mit dem Anstiege der Kontraktionskurve von Streifenpräparaten eine rasche Säureentwicklung und ein entsprechender Verlust an reduzierenden Kohlehydraten fand.

Zu schwankenden Ergebnissen gelangten dagegen *Cohn* und *Meyer*[2]), die im Preßsaft von Uteri gravider Frauen und nichtträchtiger Kühe die Bildung von Milchsäure, in letzteren auch die von Phosphorsäure feststellten. Obwohl sie ausnahmslos eine Säurezunahme, dabei Milchsäure bis zu 0,2 Proz., im Preßsafte erhielten (s. Tabelle, S. 48), sehen sie in ihren Befunden doch nur eine Andeutung beider Säurebildungen und Werte, die innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung liegen, wobei sie dann schließlich von einem Ausbleiben der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung sprechen und den Gegensatz zu der reichlichen Säurebildung im quergestreiften Muskel betonen. Während sie darin ein ganz anderes Verhalten des Preßsaftes aus glatten Muskeln im Vergleich zu dem aus quergestreiften und einen sehr charakteristischen Unterschied der quergestreiften und glatten Muskulatur bezüglich der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung erblicken, wird diese prinzipielle Unterscheidung wieder aufgehoben durch die anschließende Feststellung von *Cohn*[3]) über die der glatten und quergestreiften, einschließlich der Karpfenmuskulatur, gemeinsame Fähigkeit, Hexosephosphat zu Milchsäure und Phosphorsäure abzubauen.

Auch in quantitativer Beziehung würde sich nach den von *Cohn* und *Meyer* mitgeteilten Werten ein Gegensatz zwischen der quergestreiften und glatten Muskulatur hinsichtlich der Milchsäurebildung nicht aufrecht halten lassen, da die für die erstere bekannten Prozentwerte meist sogar noch kleinere als die von ihnen bei der letzteren beobachteten sind, wie eine Zusammenstellung aus der Literatur, die an anderer Stelle gegeben wird[4]), zeigt. So fanden *Hirsch-Kauffmann*[5]) bei quergestreifter Froschmuskulatur 0,03 bis 0,04 Proz., *Meyerhof* 0,049 bis 0,16 Proz.[6]).

Auch abgesehen von den Fehlergrenzen der Methodik kann auf die absolute Höhe der bestimmten Milchsäurewerte jedenfalls kein so großes Gewicht gelegt werden, daß grundsätzliche Gegensätze zwischen verschiedenen Muskelarten aufgestellt werden. Vor allem muß dabei bedacht werden, daß *die gleichen Unterschiede schon innerhalb einer und derselben Muskelart,* nämlich der quergestreiften, zwischen den sogenannten *roten und weißen Muskeln bestehen.* So ist in weißen Froschmuskeln das Doppelte an Milchsäure gefunden worden, wie in roten[7]), womit vermutlich die schnellere Entwicklung der Totenstarre bei den weißen zusammenhängt.

Ganz allgemein darf gesagt werden, daß die *chemischen Unterschiede zwischen der quergestreiften und glatten Muskulatur oft bedeutend überschätzt*

---

[1]) *E. F. Hirsch,* Journ. of biol. Chem. **45**, 297, 1921.
[2]) *Cohn* und *Meyer,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 46, 1914.
[3]) *M. Cohn,* ebendaselbst **98**, 84, 1914.
[4]) *E. Mangold,* Ergebn. d. Physiol.
[5]) *Hirsch-Kauffmann,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **140**, 25, 1924.
[6]) *Meyerhof,* Pflügers Arch. **188**, 114, 1921; **204**, 309, 1924.
[7]) *von Fürth,* Ergebn. d. Physiol. **17**, 388, 1919.

werden. An anderer Stelle ist dies eingehend ausgeführt worden[1]). Jedenfalls sind sie meist nicht größer als diejenigen zwischen der roten und weißen Abart der quergestreiften Muskeln. Wie vorsichtig man sein muß, von einzelnen Befunden aus zu verallgemeinern, zeigen die Arbeiten von *Embden*[2]) und *Adler, Lawaczek*[3]) und *Hotta*[4]), nach denen sich bei den weißen Muskeln des Kaninchens mehr Lactacidogen[2]), andererseits weniger Restphosphorsäure und wesentlich weniger Cholesterin[3]) findet als bei den roten; daß dies aber nicht verallgemeinert werden darf, geht daraus hervor, daß es sich bei Rindermuskeln[4]) zum Teil schon wieder anders und geradezu umgekehrt verhielt.

Nach alledem ergibt sich aus den spärlichen, bisher über die glatten Muskeln in dieser Beziehung bekannten Tatsachen jedenfalls kein Grund *gegen* die Vermutung, daß auch bei ihnen die Milchsäure als Verkürzungssubstanz eine Rolle spielen könnte. Insofern erscheint die Anschauung von *Riesser* und *Heianzan*[5]), wonach bei den glatten Muskeln von einer Milchsäurebildung als Ursache der Verkürzung nicht die Rede sein könne, unbegründet, ebenso wie die mit den erwähnten Angaben der Literatur nicht übereinstimmende Angabe, daß, soviel wir heute wüßten, die glatten Muskeln beim Absterben keine Milchsäure bildeten[5]). Daß sie es doch tun, wird auch im folgenden gezeigt werden. Im Hinblick auf die Kontraktionstheorie ist es übrigens nicht ohne Bedeutung, daß auch für die prinzipielle Gleichartigkeit von osmotischen und Quellungsvorgängen in beiden *Muskelarten* durch *Gellhorn*[6]) neue Anhaltspunkte beigebracht werden konnten.

Die eigene Arbeit, über deren erste Ergebnisse wir hier berichten, sollte nun eine *systematische Untersuchung der postmortalen Milchsäurebildung glatter Muskeln* bringen. Als besonders hierfür geeignetes Versuchsobjekt wurde der *Muskelmagen von Tauben und Hühnern* mit seiner massigen Muskulatur verwendet. Da die mechanischen Veränderungen der Totenstarre, Verkürzung und Härtezunahme, für dasselbe Objekt eingehend von *Potonié*[7]) beschrieben worden sind, so bestand die Möglichkeit, deren zeitlichen Verlauf mit dem der Milchsäureentwicklung zu vergleichen und in Beziehung zu setzen. Hier seien nun die Ergebnisse am *Taubenmagen* mitgeteilt.

Methodik.

Der Muskelmagen wurde sofort nach der durch Dekapitieren erfolgten Tötung der Tauben dem Körper entnommen und von dem äußeren Fette befreit. Sodann wurde er vom Stumpfe des Drüsenmagens aus mit der Schere längs aufgeschnitten, wobei der obere und

---

[1]) *E. Mangold*, Ergebn. d. Physiol. **25**.

[2]) Siehe *Embden* und *Lawaczek*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **125**, 199 1923.

[3]) *Lawaczek*, ebendaselbst **125**, 210, 1923.

[4]) *Hotta*, ebendaselbst **125**, 220, 1923.

[5]) *Riesser* und *Heianzan*, Pflügers Arch. **207**, 313, 1925.

[6]) *Gellhorn*, ebendaselbst **208**, 380, 1925.

[7]) *H. Potonié*, ebendaselbst **209**, 395, 1925.

untere Zwischenmuskel mit durchtrennt wurde, während der Schnitt zwischen den beiden Hauptmuskeln[1]) hindurchgehend, diese vollkommen verschonte und nur die Sehnenflächen durchteilte. Nachdem die Steinchen und der Nahrungsinhalt des Muskelmagens dann entleert und abgekratzt waren, wurde noch die keratinoide Innenhaut vom Schnittrande aus gefaßt und abgezogen und auch die Sehnenspiegel zwischen den Hauptmuskeln bis zu deren Rande weggeschnitten. So entstanden zwei Präparate, deren jedes aus einem unverletzten Hauptmuskel und den beiderseits daranhängenden Hälften je eines oberen und unteren Zwischenmuskels bestand. Anfänglich wurde durch einen quer zu der schmalen Kante des Hauptmuskels geführten Schnitt jede Magenhälfte nochmals geteilt, so daß im ganzen vier möglichst gleiche Teile aus jedem Taubenmagen für die Analyse verwendet werden konnten. Bei den weiteren Versuchen wurde jeder Hauptmuskel der Länge nach durchschnitten. Es ließen sich dadurch leichter vier Stücke von beinahe gleichem Gewicht herstellen. Zwischen den Milchsäurewerten der Muskelteile, die auf die eine und die andere Art geschnitten waren, ergab sich kein prinzipieller Unterschied.

Die *Milchsäurebestimmung* erfolgte nach der von *Clausen*, *Fürth-Charnass*, *Hirsch-Kauffmann* und *Meyerhof* ausgebildeten Methode sowie persönlichen freundlichen Angaben von Prof. *Meyerhof*.

Die Vorsichtsmaßregeln begannen bereits bei der Herstellung der Präparate, die mit eisgekühlten Instrumenten auf eisgekühlter Glasplatte stattfand.

Die vier Magenteile wurden sofort in Wägegläschen mit verschlossenem Deckel gebracht, in denen sie gewogen und zunächst auch weiter bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, die meist 19 bis 20° betrug und sich während der Versuchszeit höchstens um 2°, oft nur um 0,5 bis 1°, änderte. Ein Teil wurde meist sofort verarbeitet, die anderen dann nach ½, 1, 2 Stunden oder in anderer Kombination zu verschiedenen Zeiten bis 20 Stunden nach der Tötung des Tieres. Dabei stellte es sich heraus, daß es gleichgültig ist, ob der Muskel in eisgekühlter HCl nur fein zerschnitten oder auch noch mit einem Pistill zerrieben wird; wesentliche Unterschiede ließen sich im Rahmen dieser Arbeit dabei nicht feststellen, da selbst die Milchsäurewerte bei den Mägen verschiedener Tauben immerhin beträchtliche Unterschiede aufwiesen.

Ergebnisse.

Die *absoluten Werte für den Milchsäuregehalt des Taubenmagens* liegen, wie die Tabelle I zeigt, durchaus im Rahmen der auch für die

---

[1]) Über die Anatomie des Hühner- und Taubenmagens siehe *E. Mangold*, Pflügers Arch. 111, 163, 1906.

Tabelle I.

Prozent Milchsäure in der glatten Muskulatur des Taubenmagens.

Zeit nach dem Tode	Taube																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
10—15'	0,064	0,067	0,071	0,084	0,073	0,060	0,098	0,049	0,086	—	—	—	—	—	—	0,080	0,085	0,086
30	0,085	0,084	0,086	0,098	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 h	0,085	0,093	0,110	0,097	0,108	0,095	0,140	0,079	0,119	0,107	0,070	0,088	—	—	—	—	—	—
2	0,090	0,089	0,104	0,106	0,121	0,100	—	—	—	0,109	0,060	0,094	0,093	0,094	0,046	0,110	0,103	0,094
3	—	—	—	—	0,115	0,092	0,137	—	—	0,107	0,083	0,089	0,063	0,101	0,073	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	0,106	0,093	0,120	0,092	0,075	0,080	0,074	0,084	0,069	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	0,094	0,113	—	—	—	0,067	0,093	0,065	0,113	0,094	0,076
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,091	0,080	0,056

quergestreifte Muskulatur in der Literatur angegebenen Prozente, sie stimmen aber mehr mit denjenigen für Froschmuskeln überein, während die Säugermuskeln nur beim kranken Menschen ähnlich niedrige Werte aufweisen. Die Skelettmuskulatur der Vögel, die zum Vergleich herangezogen werden könnte, ist bisher auf ihre Milchsäurebildung anscheinend noch nicht untersucht. Einzelne der Zahlenreihen zeigten im Ansteigen und Abfallen der Milchsäurewerte nicht vollkommen den sonst als typisch erscheinenden Verlauf; sie wurden jedoch für die Berechnung der Durchschnittswerte mit verwendet, da diese Schwankungen innerhalb der Fehlergrenze lagen.

Alles in allem schwankten die Werte für die frische Magenmuskulatur zwischen 0,049 und 0,098 Proz. und ergaben im Durchschnitt 0,075 Proz. Milchsäure.

Ausnahmslos zeigte sich nun eine *postmortale Zunahme des Milchsäuregehaltes*.

Die Steigerung war stets 1 Stunde post mortem bereits sehr ausgesprochen; in denjenigen Fällen, in denen das zweite Magenstück schon nach einer halben Stunde in die Salzsäure gebracht wurde, war sie auch schon zu dieser Zeit stark bemerkbar.

Nach steilem Anstieg war das Maximum im Durchschnitt nach 1 bis 3 Stunden post mortem erreicht. Der höchste beobachtete Milchsäuregehalt betrug 0,140 Proz.

Nach dem einmal erreichten Höhepunkt blieb der Milchsäuregehalt, wenn man die Fehlergrenzen

in Betracht zieht, meist einige Stunden lang etwa auf der gleichen Höhe, um dann allmählich wieder abzusinken.

Schließlich ergaben die 20 Stunden post mortem ausgeführten Analysen mit einem Durchschnitt von 0,072 Proz. und Schwankungen von 0,056 bis 0,091 Proz. keinen wesentlichen Unterschied mehr von dem Milchsäuregehalt in der frischen Magenmuskulatur.

Da, wie schon anfangs erwähnt wurde, der Unterschied in den Milchsäurewerten der verschiedenen Taubenmägen ziemlich groß ist, außerdem mit den vier jedesmal nur zur Verfügung stehenden Magenteilen die Verarbeitung zu möglichst viel verschiedenen Zeiten vorgenommen wurde, so läßt sich aus den absoluten Zahlen nicht ohne weiteres eine Durchschnittskurve gewinnen. Es wurde daher noch folgende Umrechnung angestellt:

Zunächst wurde aus sämtlichen für 1 Stunde post mortem gefundenen Milchsäurewerten, da für deren Zeitpunkt die meisten Einzeluntersuchungen vorlagen, der Durchschnitt berechnet. Dieser wurde sodann in die Zahlenreihen aller derjenigen Versuche, die eine Bestimmung für 1 Stunde post mortem enthielten, als Wert für diesen Zeitpunkt eingesetzt und von hier aus die Werte für die übrigen Zeitpunkte den tatsächlich gefundenen Unterschieden gemäß verändert. Der sich hierbei für 2 Stunden post mortem ergebende Wert wurde dann in derselben Weise für die Zahlenreihen derjenigen Versuche verwendet, die den Wert für 1 Stunde post mortem nicht enthielten. So ergaben sich vergleichbare Werte, und es entstand die reduzierte Durchschnittskurve der Abb. 1.

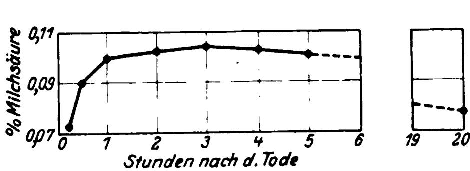


Abb. 1. Durchschnittskurve der postmortalen Milchsäurewerte im Taubenmagen.

Von besonderem Interesse mußte es nun sein, diese *Durchschnittskurve der Milchsäurebildung* mit der zeitlichen Entwicklung der *postmortalen mechanischen Veränderungen* der Magenmuskulatur in Beziehung zu setzen. Dies wurde durch die von *Potonié* aufgestellten Kurven für den *Verlauf der Totenstarreverkürzung* und der *sklerometrisch gemessenen Härtezunahme des Taubenmagens* ermöglicht[1]).

Ein Vergleich der Kurven für die Milchsäurebildung mit denjenigen für die Verkürzung und Härtezunahme mußte zeigen, ob auch für die glatte Muskulatur die für die quergestreifte festgestellte Beziehung gilt, wonach der Schnelligkeit und Größe der Milchsäureanhäufung auch die Schnelligkeit des Eintritts der Totenstarre entspricht[2]).

---

[1]) *H. Potonié*, Pflügers Arch. **209**, 395, 1925.

[2]) *von Fürth*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., 4, 351, 1923.

Tatsächlich ergab sich nun, daß dies auch bei unserem glattmuskeligen Versuchsobjekt in einer durchaus befriedigenden Weise zutrifft. Denn die Kurven für die mechanischen Veränderungen zeigen einen, demjenigen der Milchsäurebildung hinsichtlich der Steilheit und der zeitlichen Verhältnisse außerordentlich ähnlichen Anstieg, der bei Beginn der Registrierung ½ Stunde post mortem nachweisbar war und nach 2 Stunden seinen relativen Höhepunkt erreicht hatte. Unverkennbar beginnt also die Milchsäurebildung mindestens gleichzeitig, wenn nicht sogar etwas früher als die Entwicklung der mechanischen Veränderungen. Das Maximum ist jedenfalls bei der Milchsäurebildung früher erreicht.

Es läßt sich natürlich hiernach nicht sicher entscheiden, ob diesen zeitlichen Beziehungen ein ursächlicher Zusammenhang zugrunde liegt. Das zeitliche Verhältnis spricht aber jedenfalls dafür, daß, in Analogie zur quergestreiften, auch für die glatte Muskulatur die spontane postmortale Anhäufung der Milchsäure im Sinne einer Verkürzungssubstanz die hauptsächlich zunächst greifbare Bedingung für die Auslösung der mechanischen Veränderungen, Verkürzung und Verhärtung, bei der Totenstarre darstellt.

Daß zur Entwicklung dieser postmortalen Kontraktur offenbar das Zusammentreffen *mehrerer* Bedingungen erforderlich ist, die zum Teil die Starrebereitschaft[1]) hervorbringen, zum Teil dann den Anstieg der Kontraktion auslösen, hat der eine von uns an anderer Stelle eingehend begründet[2]).

Zusammenfassung.

Nach Untersuchungen am Muskelmagen von Tauben tritt in diesem glattmuskeligen Organ nach der Isolierung ausnahmslos eine Zunahme der Milchsäurebildung auf, die nach 1 bis 3 Stunden ihren Höhepunkt erreicht. Nach dem zeitlichen Verlauf der Milchsäurebildung ist anzunehmen, daß diese auch bei der glatten Muskulatur mit den mechanischen Veränderungen bei der Totenstarre (Verkürzung und Härtezunahme) in ursächlichem Zusammenhang steht.

---

[1]) *E. Mangold*, Deutsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 16.
[2]) *Derselbe*, Ergebn. d. Physiol. **25**.

Fortgesetzte Untersuchungen über den Kohlehydratstoffwechsel des zentralen Nervensystems. III.

Kohlehydrate und Glykogengehalt des zentralen Nervensystems bei normalen, narkotisierten und längere Zeit hindurch mit Bromnatrium behandelten Tieren.

Von

S. Uchida.

[Aus dem physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 29. September 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In zwei vorausgehenden Arbeiten des Berner physiologischen Instituts hat sich *Takahashi* mit dem Kohlehydratstoffwechsel des zentralen Nervensystems befaßt. Es gelang ihm, einen zwar kleinen, aber konstanten Gehalt von Glykogen im Gehirn nachzuweisen. Es bestanden gewisse Zweifel, und zwar aus methodischen Gründen, ob das gefundene Produkt wirklich Glykogen sei. Es ist diese Frage in der *Takahashi*schen Arbeit behandelt worden. Tatsächlich war es notwendig, besondere methodische Vorkehrungen zu treffen. Mit Hilfe von diesen gelang es *Takahashi*, zu sichern, daß das von ihm dargelegte Produkt Glykogen sei. Auch Prof. *Karrer* hat ein von *Takahashi* dargestelltes Präparat untersucht und diejenigen Eigenschaften gefunden, welche dafür sprechen, daß das Präparat Glykogen sei. Sodann konnte *Takahashi* zeigen, daß der Glykogengehalt des Gehirns zäh allen Eingriffen widerstand, welche an anderen Orten wesentlich das Glykogen vermindern. Es gab nur einen Eingriff, durch welchen eine starke Herabsetzung des Glykogengehalts des Gehirns erzeugt werden konnte, und das war ein solcher, welcher zu Krampfzuständen zentralen Ursprungs führte.

Wegen dieses wichtigen Ergebnisses von *Takahashi*, welches zum erstenmal einen autonomen Kohlehydratstoffwechsel des zentralen Nervensystems wahrscheinlich machte und worüber seitdem auch die interessante Arbeit von *Winterstein* und *Hirschberg*[1]) berichtet, habe ich auf Anregung von Prof. *Asher* untersucht, wie es sich mit dem Kohlehydrat des Gehirns bei verschiedenen Arten der Narkose verhielte. Zu diesem Zwecke habe ich Äther, Chloroform, Urethan,

[1]) *H. Winterstein* und *E. Hirschberg*, diese Zeitschr. **158**, 351, 1925,

Morphium und Bromnatrium benutzt. Die Auswahl geschah nach dem Gesichtspunkt der narkotisierenden Substanzen mit recht verschiedener Wirkungsweise.

Die von mir benutzten Tiere waren Ratten, erstens weil diese sich sehr gut zu Narkoseversuchen eignen, zweitens weil an diesen Tieren die chemischen Methoden der Bestimmung der Kohlehydrate des Gehirns ausgearbeitet worden waren.

Zur Darstellung des Glykogens habe ich mich der von *Takahashi* modifizierten Methode von *Rona* und *Eweyk* bedient. Ich beschreibe dieselbe kurz.

Das Gehirngewebe wurde mit kaltem Wasser abgespült und in etwa bohnengroße Stücke zerschnitten. Diese Zerkleinerung wurde erst vorgenommen, nachdem die Stücke durch eine Eiskochsalzkältemischung fest durchgefroren waren. Unter Zusatz von Quarzsand wurde die Masse im Mörser fein zerrieben. Sodann wurde der Gewebequarzsandbrei mit 3proz. Natriumfluoridlösung (etwa 6 ccm pro 10 g Gewebe) eine Zeitlang verrieben, dann 3proz. Trichloressigsäure (10 ccm pro 10 g Gewebe) zugesetzt und gut verrührt. Nach Zusatz von reichlich destilliertem Wasser wurde abgenutscht. Der Rückstand wurde in den Kolben zurückgebracht und nach Zusatz von Aqua destillata wiederholt stark geschüttelt. Nach kurzer Zeit Stehenlassen wird die überstehende Flüssigkeit abfiltriert. Die zuletzt beschriebenen Manipulationen werden achtmal wiederholt. Das gesamte Filtrat wird schließlich in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade eingedampft. Nach dem Abkühlen wird das eingeengte Filtrat durch Kalilauge auf etwa 5 Proz. Alkaleszenz gebracht, sodann mit dem zweimaligen Volumen 95proz. Alkohols versetzt und über Nacht stehengelassen. Während dieser Zeit setzt sich ein weißer, reiner Niederschlag zu Boden. Der Niederschlag wird nach der *Pflüger*schen Methode dreimal mit 60proz., zweimal mit 95proz., einmal mit absolutem Alkohol, sodann zweimal mit Äther und schließlich noch einmal mit absolutem Alkohol gewaschen. Zur quantitativen Bestimmung wurde nach der *Pflüger*schen Methode invertiert.

Die freien Kohlehydrate habe ich mit der nachfolgenden Methode bestimmt.

Ein 60proz. Alkoholextrakt wird in einem Porzellanschälchen eingedampft. Danach wird etwa $^1/_3$ Volumen destillierten Wassers zugesetzt und bis zur Vertreibung des gesamten Alkohols auf dem Wasserbade eingedampft. Hierdurch kommt es zu einer Eiweißkoagulation. Die Masse wird durch ein kleines Faltenfilter filtriert. Nach wiederholtem Auswaschen mit kochend heißem destillierten Wasser werden zum Filtrat einige Tropfen 5proz. Essigsäure, etwa ein halber Eßlöffel Talkum und 3 ccm Äther pro 50 ccm Extrakt zu-

gesetzt. Der Extrakt wird noch einmal auf dem Wasserbade eingedampft, um die Fette und die Reste des Eiweißes niederzuschlagen. Die Erwärmung geschieht elektrisch, unter Vermeidung einer offenen Flamme. Die Lösung wird durch ein kleines Filter filtriert und mit destilliertem Wasser wiederholt gewaschen. Das ganz klare Filtrat erweist sich, mit Sulfosalicylsäure geprüft, als vollständig eiweißfrei.

Was die Methode der Narkose mit flüssigen Narkoticis anbelangt, so habe ich mich einer Kammer bedient, in welcher sich die Tiere befanden. Durch diese Kammer wurde Luft durchgesaugt, welche zwei Flaschen vorher passiert hatte. Die eine Flasche enthielt das Narkoticum, die andere Flasche enthielt Wasser. Beide Flaschen waren mit Vorrichtungen versehen, welche gestatteten, die Menge von Luft, welche durchtrat, genau einzuregulieren.

Morphium und Urethan wurden subkutan injiziert. Bromnatrium wurde in passender Dosierung der Nahrung zugesetzt.

Den allgemeinen Verlauf der Narkose habe ich in meinen Protokollen angegeben.

Meine Protokolle bringe ich gemeinschaftlich am Ende der Arbeit und kann daher an dieser Stelle die Ergebnisse meiner Versuche mitteilen.

Ich habe dieselben zur Übersicht auch graphisch dargestellt.

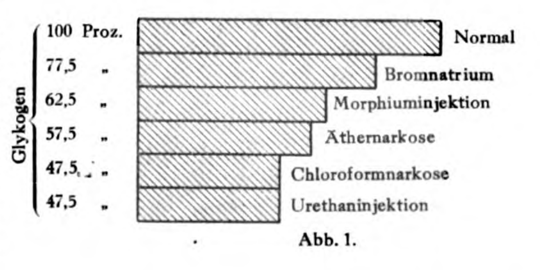


Abb. 1.

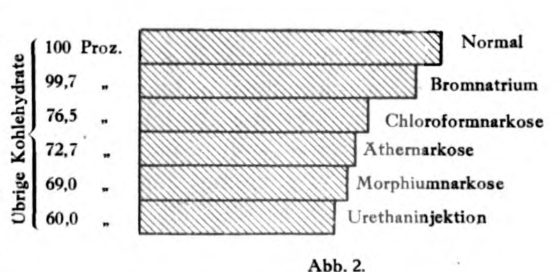


Abb. 2.

Die graphische Darstellung zeigt, daß nach Urethaninjektion die Glykogenabnahme des Gehirns am größten war. Nenne ich den normalen Gehalt des Glykogens im Gehirn 100, so beträgt er nach Urethaninjektion, die bis zur Narkose führte, nur noch 47,5 Proz. Ebenso groß ist auch die Abnahme nach Chloroformnarkose, bis zur vollständigen Narkose nämlich, es verbleiben nur noch 47,5 Proz. Etwas geringer, aber immer noch sehr merklich, ist die Abnahme des Glykogens des Gehirns nach Äthernarkose. Es verbleiben dem Gehirn nach tiefer Äthernarkose 57,5 Proz. Noch etwas geringer ist die Abnahme des Glykogens im Gehirn nach Morphiuminjektion. Es verbleiben dem

Gehirn nach einschläfernden Morphiuminjektionen 62,5 Proz. Glykogen. Am allergeringsten ist die Abnahme des Glykogens nach reichlicher Zufuhr von Bromnatrium. Es verbleiben dem Gehirn immer noch 77,5 Proz. seines Glykogengehalts. Diese Tatsache ist um so bemerkenswerter, als die Tiere durch andauernde Zufuhr von Bromnatrium in einen sehr schlechten Zustand gerieten. Genau das gleiche Ergebnis finden wir, wenn wir die Abnahme der übrigen Kohlehydrate betrachten, nur mit dem Unterschied, daß die Abnahme bei allen Arten der Narkose sehr viel geringer war, aber die Abstufung die gleiche ist.

Als bemerkenswertestes Ergebnis meiner Versuche betrachte ich die geringe Abnahme des Glykogens nach reichlicher Bromnatriumzufuhr, denn sie zeigt, daß eine Substanz wie Bromnatrium, welche, wie es die Pharmakologen ausdrücken, eine eminente Beruhigung auf das Zentralnervensystem hat, auch den Glykogengehalt am wenigsten in Mitleidenschaft zieht. Daß er überhaupt sinkt, muß wohl dem außerordentlich schlechten Zustande zugeschrieben werden, in welchen die Tiere durch Bromnatriumzufuhr geraten. Was nun die anderen Substanzen anbelangt, so scheint mir, daß man die merkliche Herabsetzung des Glykogengehalts des Gehirns nach Äther, Chloroform und wohl auch nach Urethaninjektion auf den anfänglichen Exzitationszustand zurückzuführen hat. In der nachfolgenden tiefen Narkose ist natürlich keine Gelegenheit mehr gegeben, um den Glykogenbestand wieder zu ersetzen. Auch für das Morphium bin ich geneigt, von den Tieren der Art der Ratten eine anfängliche Exzitation anzunehmen. So aufgefaßt, stehen meine Ergebnisse im Einklang mit den Schlüssen, zu welchen auf einem ganz anderen Wege *Takahashi* gelangt ist.

Zusammengefaßt sind die Ergebnisse der vorstehenden Arbeit die folgenden:

1. Narkose mit Äther, Chloroform und Urethan führt zu einer merklichen Herabsetzung des Glykogengehalts des Gehirns.

2. Bei andauernder Bromnatriumzufuhr kommt es nur zu einer geringfügigen Verminderung des Glykogenbestandes des Gehirns, die sich durch den schlechten Zustand der Tiere erklärt.

Morphium nimmt eine Mittelstellung ein.

3. Diese Befunde stehen im Einklang mit der Auffassung von *Takahashi*, daß Erregungszustände des Gehirns es vornehmlich sind, welche den Glykogenbestand desselben vermindern.

Literatur.

1) *E. Pflüger*, Pflügers Arch. **114**, 1906. — 2) *K. Grube*, Biochem. Arbeitsmethode **2**, 1, 1909. — 3) *Hoppe-Seyler*, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Berlin 1924. — 4) *Rona* und *Eweyk*, diese Zeitschr. **149**, 174, 1924. — 5) *Meyerhof*, Pflügers Arch. **185**. — 6) *K. Takahashi*, diese Zeitschr. **154**, 1924. — 7) *Derselbe*, ebendaselbst **159**, 484, 1925.

Tabelle I. Normal.

Datum 1925	Nr. und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht d. Tieres g	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt pro g Gehirn mg	Gewicht des Gehirns g
			Glykogen	0,35	
6. V.	1 ♂	253	Übrige Kohlehydrate .	0,45	1,7
			Summe d. Kohlehydrate	0,80	
			Glykogen	0,39	
7. V.	2 ♂	270	Übrige Kohlehydrate .	0,43	1,8
			Summe d. Kohlehydrate	0,82	
			Glykogen	0,48	
8. V.	3 ♀	270	Übrige Kohlehydrate .	0,49	1,8
			Summe d. Kohlehydrate	0,97	
			Glykogen	0,45	
8. V.	4 ♂	255	Übrige Kohlehydrate .	0,46	1,7
			Summe d. Kohlehydrate	0,91	
			Glykogen	0,32	
11. V.	5 ♀	265	Übrige Kohlehydrate .	0,54	1,8
			Summe d. Kohlehydrate	0,86	
			Glykogen	0,46	
12. V.	6 ♂	265	Übrige Kohlehydrate .	0,48	1,7
			Summe d. Kohlehydrate	0,94	
			Glykogen	0,41	
12. V.	7 ♂	215	Übrige Kohlehydrate .	0,53	1,8
			Summe d. Kohlehydrate	0,94	
			Glykogen	0,48	
15. V.	8 ♀	213	Übrige Kohlehydrate .	0,45	1,7
			Summe d. Kohlehydrate	0,93	
			Glykogen	0,44	
15. V.	9 ♀	213	Übrige Kohlehydrate .	0,39	1,8
			Summe d. Kohlehydrate	0,83	
			Glykogen	0,51	
18. V.	10 ♂	222	Übrige Kohlehydrate .	0,32	1,7
			Summe d. Kohlehydrate	0,83	
			Glykogen	0,43	
22. V.	11 ♂	165	Übrige Kohlehydrate .	0,38	1,5
			Summe d. Kohlehydrate	0,81	
			Glykogen	0,34	
23. V.	12 ♀	175	Übrige Kohlehydrate .	0,41	1,5
			Summe d. Kohlehydrate	0,75	
			Glykogen	0,32	
27. V.	13 ♀	195	Übrige Kohlehydrate .	0,35	1,5
			Summe d. Kohlehydrate	0,67	
			Glykogen	0,31	
8. VI.	55 ♀	165	Übrige Kohlehydrate .	0,48	1,5
			Summe d. Kohlehydrate	0,79	
			Glykogen	0,33	
8. VI.	56 ♂	153	Übrige Kohlehydrate .	0,41	1,4
			Summe d. Kohlehydrate	0,74	
			Glykogen	0,40	
Durchschnitt		219	Übrige Kohlehydrate .	0,43	1,6
			Summe d. Kohlehydrate	0,83	

Mit Brot und Milch gefüttert

Tabelle II. Äthernarkose.

Datum 1925	Nr. und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht des Tieres g	Äthermenge u. Zeitdauer bis Tiefnarkose	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt pro g Gehirn mg	Gewicht des Gehirns g	
13. V.	14 ♂	265	5 ccm 20′	Glykogen	0,15	1,8	Mit Brot und Milch gefüttert
				Übrige Kohlehydrate .	0,35		
				Summe d. Kohlehydrate	0,50		
13. V.	15 ♀	255	6 ccm 25′	Glykogen	0,14	1,7	
				Übrige Kohlehydrate .	0,26		
				Summe d. Kohlehydrate	0,40		
14. V.	16 ♀	235	6 ccm 25′	Glykogen	0,26	1,6	
				Übrige Kohlehydrate .	0,20		
				Summe d. Kohlehydrate	0,46		
14. V.	17 ♂	245	6 ccm 20′	Glykogen	0,27	1,7	
				Übrige Kohlehydrate .	0,39		
				Summe d. Kohlehydrate	0,66		
17. V.	18 ♂	180	5 ccm 20′	Glykogen	0,30	1,5	
				Übrige Kohlehydrate .	0,23		
				Summe d. Kohlehydrate	0,53		
19. V.	23 ♀	170	5 ccm 20′	Glykogen	0,33	1,4	
				Übrige Kohlehydrate .	0,37		
				Summe d. Kohlehydrate	0,70		
5. VI.	49 ♂	185	5 ccm 20′	Glykogen	0,21	1,5	
				Übrige Kohlehydrate .	0,33		
				Summe d. Kohlehydrate	0,54		
5. VI.	50 ♀	175	5 ccm 20′	Glykogen	0,17	1,4	
				Übrige Kohlehydrate .	0,28		
				Summe d. Kohlehydrate	0,45		
5. VI.	51 ♀	182	5 ccm 20′	Glykogen	0,25	1,4	
				Übrige Kohlehydrate .	0,32		
				Summe d. Kohlehydrate	0,57		
5. VI.	52 ♀	165	6 ccm 20′	Glykogen	0,21	1,4	
				Übrige Kohlehydrate .	0,35		
				Summe d. Kohlehydrate	0,56		
Durchschnitt		205	5 ccm 21′	Glykogen	0,23	1,5	
				Übrige Kohlehydrate .	0,31		
				Summe d. Kohlehydrate	0,54		

Wenn man diesen Durcnschnitt mit dem bei normalen Tieren vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme	
	mg	Proz.
Glykogen	0,17	42,5
Übrige Kohlehydrate	0,12	27,9
Summe der Kohlehydrate	0,29	34,9

Tabelle III. Chloroformnarkose.

Datum 1925	Nr. und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht des Tieres g	Chloroformmenge und Zeitdauer bis Tiefnarkose	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt pro g Gehirn mg	Gewicht des Gehirns g	
				Glykogen	0,17		Mit Brot und Milch gefüttert
23. V.	31 ♀	180	3 ccm 25′	Übrige Kohlehydrate .	0,33	1,5	
				Summe d. Kohlehydrate	0,50		
				Glykogen	0,23		
23. V.	32 ♀	190	3 ccm 25′	Übrige Kohlehydrate .	0,28	1,5	
				Summe d. Kohlehydrate	0,51		
				Glykogen	0,15		
26. V.	34 ♀	220	3 ccm 20′	Übrige Kohlehydrate .	0,36	1,5	
				Summe d. Kohlehydrate	0,51		
				Glykogen	0,20		
4. VI.	45 ♂	180	3 ccm 20′	Übrige Kohlehydrate .	0,25	1,5	
				Summe d. Kohlehydrate	0,45		
				Glykogen	0,19		
4. VI.	46 ♂	175	3 ccm 20′	Übrige Kohlehydrate .	0,28	1,5	
				Summe d. Kohlehydrate	0,47		
				Glykogen	0,16		
4. VI.	47 ♂	212	3 ccm 20′	Übrige Kohlehydrate .	0,33	1,6	
				Summe d. Kohlehydrate	0,49		
				Glykogen	0,22		
4. VI.	48 ♂	190	3 ccm 20′	Übrige Kohlehydrate .	0,32	1,5	
				Summe d. Kohlehydrate	0,54		
				Glykogen	0,14		
6. VI.	57 ♀	207	4 ccm 25′	Übrige Kohlehydrate .	0,39	1,6	
				Summe d. Kohlehydrate	0,53		
				Glykogen	0,17		
6. VI.	58 ♂	175	4 ccm 25′	Übrige Kohlehydrate .	0,35	1,6	
				Summe d. Kohlehydrate	0,52		
				Glykogen	0,24		
6. VI.	61 ♀	183	4 ccm 20′	Übrige Kohlehydrate .	0,37	1,6	
				Summe d. Kohlehydrate	0,61		
				Glykogen	0,19		
Durchschnitt		191	3 ccm 23′	Übrige Kohlehydrate .	0,33	1,6	
				Summe d. Kohlehydrate	0,52		

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem bei normalen Tieren vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme	
	mg	Proz.
Glykogen	0,21	52,5
Übrige Kohlehydrate	0,10	23,2
Summe der Kohlehydrate	0,31	37,3

Tabelle IV. Morphiuminjektion.

Datum 1925	Nr. und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht des Tieres g	Morphiuminjektion. Menge u. Zeitdauer v. Injektion b. Tötung	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt pro g Gehirn mg	Gewicht des Gehirns g	
18. V.	19 ♀	225	0,005 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,31 0,38 0,69	1,6	Mit Brot und Milch gefüttert
18. V.	20 ♂	245	0,005 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,33 0,21 0,54	1,7	
20. V.	21 ♂	175	0,006 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,33 0,25 0,58	1,5	
20. V.	22 ♂	180	0,006 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,32 0,33 0,55	1,5	
20. V.	24 ♂	195	0,006 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,21 0,31 0,52	1,5	
2. VI.	35 ♀	235	0,01 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,19 0,28 0,47	1,6	
2. VI.	36 ♀	260	0,01 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,21 0,31 0,52	1,7	
2. VI.	37 ♀	215	0,01 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,18 0,24 0,42	1,6	
9. VI.	59	188	0,01 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,21 0,35 0,56	1,6	
9. VI.	60	169	0,01 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,19 0,36 0,55	1,6	
Durchschnitt		190	0,08 ccm 60′	Glykogen . . . . Übrige Kohlehydrate . Summe d. Kohlehydrate	0,25 0,30 0,55	1,6	

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem bei normalen Tieren vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme	
	mg	Proz.
Glykogen	0,15	37,5
Übrige Kohlehydrate	0,13	30,2
Summe der Kohlehydrate	0,28	33,70

Tabelle V. Urethaninjektion.

Datum 1925	Nr. und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht des Tieres g	Urethaninjektion. Menge u. Zeitdauer v. Injektion b. Tötung	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt pro g Gehirn mg	Gewicht des Gehirns g	
18. V.	25 ♀	225	0,15 ccm 60′	Glykogen	0,15	1,7	Mit Brot und Milch gefüttert
				Übrige Kohlehydrate .	0,32		
				Summe d. Kohlehydrate	0,47		
18. V.	26 ♀	236	0,15 ccm 60′	Glykogen	0,17	1,8	
				Übrige Kohlehydrate .	0,29		
				Summe d. Kohlehydrate	0,46		
19. V.	27 ♀	175	0,15 ccm 60′	Glykogen	0,25	1,5	
				Übrige Kohlehydrate .	0,30		
				Summe d. Kohlehydrate	0,55		
19. V.	28 ♀	212	0,15 ccm 60′	Glykogen	0,27	1,6	
				Übrige Kohlehydrate .	0,26		
				Summe d. Kohlehydrate	0,53		
22. V.	29 ♂	170	0,15 ccm 60′	Glykogen	0,23	1,5	
				Übrige Kohlehydrate .	0,34		
				Summe d. Kohlehydrate	0,57		
22. V.	30 ♀	175	0,1 ccm 60′	Glykogen	0,16	1,5	
				Übrige Kohlehydrate .	0,41		
				Summe d. Kohlehydrate	0,57		
27. V.	33 ♀	185	0,1 ccm 60′	Glykogen	0,14	1,4	
				Übrige Kohlehydrate .	0,23		
				Summe d. Kohlehydrate	0,37		
2. VI.	38 ♀	225	0,1 ccm 60′	Glykogen	0,18	1,7	
				Übrige Kohlehydrate .	0,34		
				Summe d. Kohlehydrate	0,52		
8. VI.	53 ♂	145	0,08 ccm 60′	Glykogen	0,16	1,4	
				Übrige Kohlehydrate .	0,32		
				Summe d. Kohlehydrate	0,48		
8. VI.	54 ♀	140	0,08 ccm 60′	Glykogen	0,18	1,4	
				Übrige Kohlehydrate .	0,29		
				Summe d. Kohlehydrate	0,47		
Durchschnitt		184	0,12 ccm 60′	Glykogen	0,19	1,6	
				Übrige Kohlehydrate .	0,27		
				Summe d. Kohlehydrate	0,46		

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem bei normalen Tieren vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme	
	mg	Proz.
Glykogen	0,21	52,5
Übrige Kohlehydrate	0,16	40,0
Summe der Kohlehydrate	0,37	46,3

Tabelle VI.

Nr. und Geschlecht des Tieres	Datum 1925	Körpergewicht g	Dose des Bromnatriums g	Bemerkungen
39 ♀	19. V.	161	0,2	
	20. V.	158	0,2	Untätig, frißt aber gut
	21. V.	120	0,2	Schläfrig (Geburt)
	22. V.	118	0,3	Das Tier ist ganz schlaff, schreitet nicht mehr
	23. V.	110	0,3	Tiefer Schlaf, frißt nicht mehr
40 ♀	19. V.	159	0,2	
	20. V.	158	0,2	Nicht munter, frißt aber gut
	21. V.	126	0,3	Schlaf, aber zuweilen Erwachen
	22. V.	125	0,3	Tiefer Schlaf, frißt nicht mehr
41 ♂	20. V.	120	0,2	
	21. V.	110	0,2	Untätig, frißt aber gut
	22. V.	106	0,2	Schläfrig
	23. V.	105	0,2	Schlaf
	24. V.	—	0,2	Das Tier bleibt im tiefen Schlaf
	25. V.	91	0,2	Frißt nicht mehr
42 ♂	20. V.	108	0,2	
	21. V.	107	0,2	Untätig, frißt aber gut
	22. V.	108	0,2	Schreitet nicht mehr
	23. V.	100	0,2	
	24. V.	—	0,2	Schläfrig
	25. V.	85	0,2	Das Tier bleibt schlaff und unempfindlich gegen Reiz
43 ♂	20. V.	110	0,2	
	21. V.	110	0,2	Untätig
	22. V.	108	0,2	Nicht munter, schläfrig
	23. V.	90	0,2	Schlaf, schreitet nicht mehr
	24. V.	—	0,2	Unempfindlich gegen Reiz
	25. V.	80	0,2	Im tiefen Schlaf
44 ♀	19. V.	118	0,2	
	20. V.	116	0,2	
	21. V.	117	0,2	Untätig
	22. V.	117	0,2	Schlaf. Wenn das Tier gereizt wird, so schreckt es auf
	23. V.	110	0,2	
	24. V.	—	0,2	
	25. V.	105	0,2	Frißt nicht mehr
62 ♂	30. V.	195	0,1	
	31. V.	—	0,1	
	1. VI.	—	0,1	
	2. VI.	190	0,1	Munter, frißt gut

Tabelle VI (Fortsetzung).

Nr. und Geschlecht des Tieres	Datum 1925	Körpergewicht g	Dose des Bromnatriums g	Bemerkungen
62 ♂	3. VI.	185	0,1	Untätig
	4. VI.	180	0,1	
	5. VI.	178	0,1	Appetitmangel
	6. VI.	178	0,1	Schläfrig
	7. VI.	—	0,1	
	8. VI.	168	0,2	Im tiefen Schlaf
	9. VI.	163	0,2	Frißt nicht mehr
64 ♂	30. V.	175	0,1	
	31. V.	—	0,1	
	1. VI.	—	0,1	
	2. VI.	175	0,1	Frißt gut
	3. VI.	173	0,1	
	4. VI.	170	0,1	Untätig, frißt aber gut
	5. VI.	165	0,2	Schläfrig
	6. VI.	164	0,2	Im tiefen Schlaf, schreckt aber gegen Reiz auf
	7. VI.	—	0,2	
	8. VI.	160	0,3	Schreitet nicht mehr
	9. VI.	154	0,3	Im tiefen Schlaf
	10. VI.	150	0,3	Frißt nicht mehr
63 ♀	30. V.	210	0,1	
	31. V.	—	0,1	
	1. VI.	—	0,1	
	2. VI.	205	0,1	Munter, frißt gut
	3. VI.	203	0,1	
	4. VI.	195	0,2	Untätig
	5. VI.	195	0,2	Schläfrig
	6. VI.	193	0,2	Schläfrig
	7. VI.	—	0,3	
	8. VI.	185	0,3	Das Tier bleibt im tiefen Schlaf
	9. VI.	173	0,3	Frißt nicht mehr
65 ♀	2. VI.	183	0,2	
	3. VI.	183	0,2	
	4. VI.	180	0,2	Untätig
	5. VI.	152	0,2	Im tiefen Schlaf (Geburt)
	6. VI.	148	0,1	Unwohl
	7. VI.	—	0,1	
	8. VI.	143	0,3	Schläft immer
	9. VI.	142	0,3	Frißt gar nicht
	10. VI.	138	0,3	Unempfindlich gegen Reiz

Tabelle VII. Bromnatrium.

Datum 1925	Nr. und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht bei Beginn der Fütterung und unmittelbar vor der Tötung in g	Bromnatriummehl Tage gefüttert	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt pro g Gehirn mg	Gewicht des Gehirns g
22. V.	39 ♀ [1]	159	1,2	Glykogen	0,32	1,5
		125	5 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,34	
		(— 34)		Summe d. Kohlehydrate	0,66	
23. V.	40 ♀ [2]	161	1,0	Glykogen	0,33	1,4
		110	4 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,37	
		(— 50)		Summe d. Kohlehydrate	0,70	
25. V.	41 ♂ [1]	120	1,2	Glykogen	0,28	1,3
		91	6 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,38	
		(— 29)		Summe d. Kohlehydrate	0,66	
25. V.	42 ♂ [1]	108	1,2	Glykogen	0,32	1,3
		85	6 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,42	
		(— 23)		Summe d. Kohlehydrate	0,74	
25. V.	43 ♂ [1]	110	1,2	Glykogen	0,35	1,4
		80	6 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,39	
		(— 30)		Summe d. Kohlehydrate	0,74	
25. V.	44 ♀ [1]	118	1,4	Glykogen	0,34	1,4
		105	7 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,37	
		(— 13)		Summe d. Kohlehydrate	0,71	
9. VI.	62 ♂ [1]	195	1,3	Glykogen	0,24	1,6
		163	11 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,48	
		(— 32)		Summe d. Kohlehydrate	0,72	
9. VI.	63 ♀ [1]	210	2,0	Glykogen	0,36	1,7
		173	11 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,44	
		(— 37)		Summe d. Kohlehydrate	0,80	
10. VI.	64 ♂ [1]	175	2,2	Glykogen	0,23	1,5
		150	12 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,36	
		(— 25)		Summe d. Kohlehydrate	0,59	
10. VI.	65 ♀ [3]	183	1,9	Glykogen	0,29	1,6
		138	9 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,41	
		(— 45)		Summe d. Kohlehydrate	0,70	
Durchschnitt		154	1,5	Glykogen	0,31	1,5
		122	8 Tage	Übrige Kohlehydrate .	0,39	
		(— 32)		Summe d. Kohlehydrate	0,70	

[1]) Mit Brot und Milch, *Na Br*, gefüttert. — [2]) Dasselbe, 21. V. Geburt gemacht. — [3]) Dasselbe, 5. VI. Geburt gemacht.

Wenn man diesen Durchschnitt mit den normalen Tieren vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme	
	mg	Proz.
Glykogen	0,09	22,5
Übrige Kohlehydrate	0,04	9,3
Summe der Kohlehydrate	0,13	15,6

Ultrafiltrationsversuche mit Ureaselösungen.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 10. Oktober 1925.)

Während vorläufig noch alle Untersuchungen, welche anstreben, die Konstitution der Enzyme restlos aufzuklären, zur Ergebnislosigkeit verurteilt sind, treten immer mehr als erste Ziele der Enzymkonstitutionsforschung zwei Gesichtspunkte in den Vordergrund: Das Hauptziel bleibt, die Gruppierungen herauszuschälen, welche im Enzymkomplex enzymatische Wirkungen entfalten. Diese Untersuchungen sind durch Modellstudien zu ergänzen. Daneben geht die Analyse des Enzymkomplexes, welche aufklärt, was im Enzymkomplex für die Enzymwirkung vollkommen gleichgültig und was dagegen die Enzymwirkung positiv oder negativ beeinflußt. Wie man diese Begleitkörper der Enzyme im engeren Sinne zunächst benennt, ist weniger wichtig. Wesentlicher ist, festzustellen, ob sie an die eigentlichen Enzymgruppen verankert sind, ob sie auf übersehbare Weise, z. B. durch Änderung des kolloiden Milieus, durch Beeinflussung der Reaktion, als Schutzstoffe usw. wirken oder ob ihre Hilfswirkung noch ungeklärt ist.

Bei der Urease nehmen als Auxokörper eine durchaus überragende Stellung das Cyankalium und die Aminosäuren ein, beide auch in gut gepuffertem Milieu. Calcium- und Strontiumsalze wirken überhaupt nur im Milieu, das mit Phosphaten gepuffert ist. Der Mechanismus der Wirkung des Cyankaliums und der Aminosäuren ist noch ungeklärt. Selbstverständlich ist daran zu denken, daß diese Substanzen Metallspuren unwirksam machen, jedoch ist es nicht wahrscheinlich, daß sich ihre Wirkung in dieser Richtung erschöpft. Wichtig ist, daß diese Auxokörper vom Enzymkomplex gebunden werden.

Von Anfang an haben wir die Vermutung geäußert, daß auch in der Natur mit dem Vorhandensein von Auxokörpern neben der Urease zu rechnen wäre[1]).

Um die Bestandteile eines Ureasepräparats zu fraktionieren, scheint die Methode der Ultrafiltration wegen des besonders schonenden Vor-

[1]) *Jacoby* und *Sugga*, diese Zeitschr. 69, 1915.

gehens zweckmäßig. Durch die Ultrafiltration ist man bekanntlich imstande, ohne jeden chemischen Eingriff und ohne Zusätze in der Natur vorkommende Stoffe voneinander zu trennen. Dieses einfache und exakte Verfahren haben wir dazu verwandt, um in Ureasepräparaten die Kolloide von den Kristalloiden zu trennen und dabei das Verhalten des eigentlichen Enzyms und der Auxokörper zu studieren.

Zur Anwendung kamen Membranfilter und Ultrafeinfilter, die auf den freundlichen Rat von Herrn Prof. *Zsigmondy* von Herrn Dr. *Tietjens* in Göttingen bezogen wurden, die Filtration erfolgte durch Porzellansaugapparate.

Als Enzym wurde Jackbohnen-Urease (Arlco-Urease) verwandt.

Die Filtration war nicht nur durch die Änderung der Fermentwirkung der Lösungen erkennbar, vielmehr zeigte sich auch noch ein sichtbares Phänomen. Wenn man die Urease in Phosphatgemischen nach *Sörensen* (p_H 7,2, m/15) löste und durch die Filter sandte, so erhielt man aus der klaren Lösung ein trübes Filtrat. Es handelt sich um eine anscheinend eiweißartige, durch gewöhnliche Filtration abfiltrierbare Ausflockung. Durch die Ultrafiltration wird anscheinend ein Schutzkolloid entfernt, wodurch das Eiweiß mehr oder weniger direkt der Ausflockung durch die Phosphate verfällt.

Um die Trübung der Lösung bei der Ultrafiltration zu vermeiden, wurden die Filtrationen in wässeriger Lösung vorgenommen und die Phosphatpufferung erst nach der Filtration vor dem Enzymversuch ausgeführt.

Es genügt, aus der sehr großen Zahl von Versuchen einige typische Beispiele wiederzugeben. Es wurden stets frische wässerige Lösungen der Urease angewandt. Es wurde 0,1 g in 100 ccm Wasser gelöst, die Lösung vor der Membranfiltration noch durch Papier filtriert. Die durch Papierfiltration erhaltene Flüssigkeit wird in den Protokollen als unfiltriert bezeichnet. Das Cyankalium wurde stets in 1 proz. Lösung, gelöst in Phosphatgemisch — je 2 ccm —, verwandt, die Kontrollen ohne Cyankalium wurden mit entsprechender Menge Phosphatgemisch angesetzt. Auch die bei jeder Probe zugesetzten 20 ccm Harnstoff (2 proz.) sind entsprechend in Phosphat gelöst. Zu jeder Probe 0,3 ccm Toluol. Die Proben bleiben immer 20 Stunden im Brutschrank.

Versuch 1. Membranfilter „mittel".

	Mit Cyankalium	Ohne Cyankalium
Unfiltriert . . .	112,1	61,3
Filtriert	56,0	10,5

Versuch 2. Membranfilter „feinst".

	Mit Cyankalium	Ohne Cyankalium
Unfiltriert . . .	114,1	69,7
Filtriert	21,7	5,4

Versuch 3. Ultrafeinfilter.

	Mit Cyankalium	Ohne Cyankalium
Unfiltriert . . .	110,4	28,2
Filtriert	16,1	2,0

Immer tritt also durch die Ultrafiltration eine Verminderung der Wirkung ein, immer ist noch eine Verstärkung durch Cyankalium möglich, ohne Ausnahme ist aber auch nach der Ultrafiltration die durch Cyankalium aktivierte Urease weniger wirksam als vor der Ultrafiltration.

Es ist nicht verwunderlich, daß die Filter mit den feinsten Poren auch am meisten zurückhalten. Daher werden die Lösungen, welche die Ultrafeinfilter passiert haben, am wenigsten wirksam. Man muß annehmen, daß in der Lösung Teilchen von verschiedener Größe vorhanden sind. Das bewirkt dann wohl auch, daß auch die durch Ultrafeinfilter gesandten Lösungen immer noch eine geringe Wirksamkeit besitzen. Offenbar sind hier besonders kleine Teilchen wirksam.

Diese Befunde passen zu der Vorstellung, daß die enzymatisch wirksamen Gruppen an Kolloide geknüpft sind, denen nur eine sekundäre Bedeutung zukommt. Die Teilchengröße wird eben ohne Zweifel eine Funktion dieser Kolloide sein.

Noch ein Phänomen ist hervorzuheben, welches mit den oben erwähnten Boebachtungen bei der Ultrafiltration phosphathaltiger Enzymlösungen zusammenhängt. Wir hatten bemerkt, daß solche Lösungen sich bei der Ultrafiltration — offenbar durch Entfernung eines Schutzkolloids — trüben. Mit diesem Befund stimmen nun auch folgende Beobachtungen überein: Wenn man beim Ansetzen der Versuche die klaren, durch Ultrafiltration der wässerigen Lösungen gewonnenen Filtrate pufferte, so trübten sie sich beim Zusatz des Phosphats. Das beweist also auch, daß die bei der Ultrafiltration der phosphathaltigen Enzymlösungen eintretende Trübung durch die Phosphate verursacht wird. Die unfiltrierten, wässerigen Enzymlösungen, die also noch nicht der Schutzkolloide beraubt sind, bleiben dementsprechend bei der nachträglichen Pufferung vollkommen klar.

Vor einiger Zeit hat *L. Rosenfeld*[1]) aus meinem Laboratorium über Versuche berichtet, welche dafür sprachen, daß die Auxokörper an den Enzymkomplex gebunden werden. Die Versuche dieser Mitteilung sprechen nun auch in diesem Sinne, denn man ersieht daraus, daß offenbar bei der Trennung von Kolloiden und Kristalloiden keine entscheidende Verschiebung in der Richtung der Aktivierbarkeit durch Auxokörper eintritt. Das müßte aber der Fall sein, wenn etwa das Enzym im kolloiden Anteil, die physiologischen Auxokörper sich aber im Filtrat finden.

Wir haben aber diesen Punkt auch einer direkten experimentellen Prüfung unterzogen, indem wir untersuchten, ob die Ultrafiltrate als Auxokörper für unfiltrierte Enzymlösungen verwandt werden können.

---

[1]) Diese Zeitschr. 154, 1924.

Es werden je fünf Proben angesetzt:

1.	10 ccm	Fermentlösung	+ 2 Filtrat	+ 2	Phosphatmischung
2.	10 „	„	+ 2 Wasser	+ 2 Cy in	„
3.	10 „	„	+ 2 „	+ 2	„
4.	10 „	Wasser	+ 2 Filtrat	+ 2	„
5.	10 „	„	+ 2 „	+ 2 Cy in	„

Versuch A.

Membranfilter „feinst" . . . 1. 27,6 2. 121,0 3. 41,0 4. 2,8 5. 10,7

Versuch B.

Ultrafeinfilter 1. 17,5 2. 84,2 3. 27,2 4. 0,3 5. 3,1

Die Versuche zeigen — Vergleich von 1. und 3. — eine deutliche Hemmung durch das Ultrafiltrat, während sie im übrigen die früheren Befunde bestätigen. Sicherlich besteht noch die Möglichkeit, daß ein physiologischer Auxokörper und nicht das Enzym selbst durch die Hemmungssubstanz des Ultrafiltrats gehemmt wird. Wie dem aber auch sei, jedenfalls lassen sich im Ultrafiltrat keine Auxokörper nachweisen, so daß also auch diese Versuche unsere experimentell gewonnene Annahme bestätigen, daß die Auxokörper an den Enzymkomplex gekettet sind.

Zusammenfassung.

Die Urease der Jackbohnen läßt sich durch Ultrafiltration aus der Lösung entfernen. Die Teilchengröße der einzelnen Enzymanteile scheint verschieden groß zu sein, weil sie vermutlich nicht durch das Enzym selbst, sondern durch den kolloiden Komplex bestimmt wird. Eine Trennung der das Enzym begleitenden Auxostoffe vom Enzym gelingt durch Ultrafiltration nicht, weil sie wohl an den Komplex gebunden sind. Dagegen kann man im Ultrafiltrat Hemmungssubstanzen für das Enzym nachweisen.

Die Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft hat mir für diese Untersuchungen Mittel zur Verfügung gestellt, wofür ich auch an dieser Stelle ergebensten Dank sage.

Ein Beitrag zur Theorie der antagonistischen Ionenwirkungen der Erdalkalien auf das Pflanzenplasma. VII.

Von

Hugo Kaho.

[Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des botanischen Instituts der Universität Tartu (Dorpat).]

(Eingegangen am 10. Oktober 1925.)

In den früheren Abhandlungen[1]) habe ich den Zusammenhang zwischen der Giftwirkung und dem Eindringungsvermögen der Alkalisalze in bezug auf die pflanzliche Zelle untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurde insbesondere der Einfluß der Anionen auf die Salzwirkungen erforscht.

Es zeigte sich, daß die Giftwirkung in engster Beziehung zur Permeierfähigkeit der Salze steht und diese oder jene Wirkung eines Elektrolyts vorherbestimmt. Dabei ist die Wirkung der Salze additiv aus den entgegengesetzten Wirkungen beider Salzionen zusammengesetzt.

Bei den Erdalkalisalzen haben wir es mit einem zweiwertigen Kation zu tun, das den Einfluß des Anions, insbesondere im Falle der einwertigen Anionen, zudecken könnte. Es fragt sich darum, ob verschiedene Salze der Erdalkalien mit demselben Kation und mit verschiedenen Anionen eine gleiche Giftwirkung auf das Pflanzenplasma haben würden, und ob die antagonistische Wirkung dieser Salze nur vom Kation abhängen würde.

Um diese Fragen zu beantworten, habe ich die folgenden Versuche angestellt.

Versuche.

Die Versuche wurden mit den Blattepidermisschnitten des Rotkrauts, Rhoeo discolor und Zebrina pendula angestellt. Es wurden 100 bis 200 kleine viereckige und gleich dicke Schnitte von etwa 1 mm Flächengröße in jede Lösung gebracht und in den in den Tabellen angegebenen Zeitabschnitten je 10 Schnitte herausgenommen und die lebenden Zellen durch Plasmolyse bestimmt.

---

[1]) Diese Zeitschr. **120**, 125, 1921; **128**, 284, 1921; Acta et Comm. Univ. Dorpat, A. V, **4**, 1924.

Tabelle I. Übersichtstabelle der Calciumsalzwirkungen.
Konzentration der Salze 0,18 mol. Versuchspflanze Rotkraut.
Temperatur 18°.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	$Ca(CNS)_2$	$CaBr_2$	$Ca(NO_3)_2$	$Ca(C_2H_3O_2)_2$	$CaCl_2$
30'	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1h	75,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 30	25,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2	15,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 30	7,5	100,0	100,0	100,0	100,0
3	2,5	100,0	100,0	100,0	100,0
4	0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	—	100,0	100,0	97,5	100,0
24	—	55,0	77,5	75,0	82,5
26	—	35,0	75,0	67,5	77,5
27	—	25,0	45,0	45,0	75,0
28	—	10,0	27,5	45,0	70,5
29	—	15,0	22,5	47,5	82,5
30	—	5,0	30,0	40,0	70,0
31	—	10,0	37,0	50,0	32,0
33	—	5,0	22,5	20,0	37,5
Durchschnittsproz. der lebenden Zellen	—	36,0	53,7	58,7	72,7

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Die Tabelle I zeigt, daß die Gift- (koagulierende) Wirkung der Calciumsalze auf die Rotkrautzellen eine ziemlich verschiedene ist. Das Rhodanid ist am giftigsten, hier sterben die Zellen schon nach 3 Stunden vollständig ab. Das Nitrat und Acetat haben eine ziemlich gleiche Wirkung, die aber viel schwächer ist als die des Bromids. Am unschädlichsten ist das Chlorid.

Tabelle II.
Alle Salze 0,15 mol. Versuchspflanze Zebrina pendula. Temperatur 19°.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	$Ca(CNS)_2$	$CaBr_2$	$Ca(C_2H_3O_2)_2$	$Ca(NO_3)_2$	$CaCl_2$
1h	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2	84,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3	96,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4	38,1	79,1	85,1	85,8	100,0
5	24,4	72,0	81,7	80,9	100,0
6	8,1	34,4	65,5	75,1	99,5
7	5,2	38,2	25,6	68,1	93,3
8	1,8	27,1	26,4	79,4	75,5
10	0	42,0	11,1	87,8	63,9
12	—	6,4	25,3	81,0	64,3
15	—	12,2	6,6	60,9	71,1
Durchschnittsproz. der lebenden Zellen	32,5	55,5	57,0	83,5	88,0

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Die Verhältnisse bleiben etwa dieselben, wenn die Schnitte von einer anderen Pflanze hergestellt werden und die Salzlösungen schwächer sind (vgl. Tabelle II).

Die Salze ordnen sich hier nach ihrer Aktivität, mit Ausnahme von Acetat, in derselben Reihenfolge wie bei den Rotkrautschnitten:

Rotkraut: $CNS > Br > NO_3, C_2H_3O_2 > Cl$,
Zebrina: $CNS > Br, C_2H_3O_2 > NO_3 > Cl$.

Das Acetat hat in schwachen Konzentrationen relativ stärkere Wirkung (Hydrolyse ?).

Wenden wir uns der Wirkung der anderen Erdalkalien zu.

Tabelle III.

Die Wirkung der Magnesiumsalze.

Alle Salze 0,8 mol. Versuchspflanze Rotkraut. Temperatur 18°.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	$MgBr_2$	$Mg(C_2H_3O_2)_2$	$Mg(NO_3)_2$	$MgCl_2$	$MgSO_4$
10′	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
20	92,5	100,0	100,0	100,0	100,0
30	80,0	100,0	100,0	100,0	100,0
45	35,0	100,0	100,0	100,0	100,0
55	42,5	100,0	100,0	100,0	100,0
1h	27,5	100,0	100,0	100,0	100,0
1 10	15,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 20	10,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 30	2,5	100,0	100,0	100,0	100,0
1 40	0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	—	100,0	100,0	100,0	100,0
17	—	100,0	100,0	100,0	100,0
21	—	80,0	92,0	95,0	95,0
23	—	77,5	87,0	95,0	92,0
24	—	72,5	70,0	97,0	92,5
26	—	37,5	70,0	95,0	92,5
27	—	50,0	87,0	92,5	95,0
28	—	60,0	80,0	97,5	95,0
31	—	17,5	42,5	87,5	92,5
33	—	40,0	17,5	45,0	87,5
36	—	22,5	25,0	32,5	92,5
48	—	0	2,5	5,0	40,0
Durchschnittsproz. der lebenden Zellen	—	54,8	64,4	78,3	89,6

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Die Wirkung der Salze (Tabelle III) nimmt nach folgender Reihenfolge ab:

$$Br > C_2H_3O_2 > NO_3 > Cl, SO_4.$$

Die Stellung des Acetats ist in dieser Reihe eine abweichende. Im übrigen stimmt die Reihenfolge mit den oben angeführten überein.

Tabelle IV zeigt die Versuche mit den Rhoeoschnitten und einer niedrigeren Salzkonzentration (0,2 und 0,1 mol). Die Aktivität der Salze nimmt hier nach dieser Reihenfolge ab:

$$Br > NO_3,\ Cl > C_2H_3O_2 > SO_4.$$

Tabelle IV.

Die Konzentration der Lösungen in erster Stunde 0,2 mol. und nachher 0,1 mol. Temperatur 16°. Die Versuchspflanze Rhoeo discolor.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	$MgBr_2$	$Mg(NO_3)_2$	$MgCl_2$	$Mg(C_2H_3O_2)_2$	$MgSO_4$
15′	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
30	68,6	82,9	100,0	100,0	100,0
45	67,3	95,8	100,0	100,0	100,0
1h	14,1	—	—	100,0	100,0
2	0	26,3	27,0	100,0	100,0
2	—	13,7	29,4	100,0	100,0
3 30	—	18,0	38,5	100,0	100,0
3	—	12,4	32,2	100,0	100,0
4 30	—	6,6	14,9	100,0	100,0
4	—	8,0	26,2	100,0	100,0
6 30	—	1,6	10,9	98,6	100,0
8	—	0	5,3	—	100,0
10	—	—	0	90,6	100,0
20	—	—	—	92,9	90,5
24 30	—	—	—	84,7	98,2
28	—	—	—	90,8	99,0
36	—	—	—	95,8	94,6
45	—	—	—	67,0	97,8
48	—	—	—	59,6	93,1
Durchschnittsproz. der lebenden Zellen	—	—	—	—	—

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Die Tabelle V zeigt uns die Wirkung der Bariumsalze. In Rhodanidlösung starben die Schnitte im Laufe des ersten Tages ab, in der Bromidlösung am Ende des zweiten Tages, während in Chloridlösung zu dieser Zeit noch etwa die Hälfte von Zellen am Leben waren.

Ziemlich ähnliche Verhältnisse haben wir bei den Strontiumsalzen.

Tabelle V.

Alle Salze 0,1 mol. Versuchspflanze Rhoeo discolor. Temperatur 17°.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	$Ba(CNS)_2$	$BaBr_2$	$BaCl_2$
10′	100,0	100,0	100,0
30	96,6	100,0	100,0
1h	96,5	100,0	100,0
2	84,1	100,0	100,0
3	70,5	100,0	100,0
4	56,9	100,0	100,0
5	46,7	100,0	100,0
6	16,7	100,0	100,0
7	7,4	100,0	100,0
8	2,2	100,0	100,0
19	0	84,9	100,0
21	—	66,6	100,0
23	—	51,6	100,0
24	—	59,1	93,1
28	—	56,9	90,3
31	—	49,5	69,0
41	—	33,6	73,5
45	—	9,6	49,0
Durchschnittsprozent der lebenden Zellen	32,1	78,1	93,0

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Am stärksten wirkt das Bromid (Tabelle VI), viel schwächer das Nitrat und Chlorid, die beide ziemlich gleich stark wirken.

Tabelle VI.

Alle Salze 0,2 mol. Versuchspflanze Rhoeo discolor. Temperatur 16°.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	$SrBr_2$	$Sr(NO_3)_2$	$SrCl_2$
4h	100,0	100,0	100,0
6	98,7	100,0	100,0
10	77,9	21,4	90,8
11	85,9	21,7	95,8
20 30′	87,7	73,2	88,1
24	11,4	93,1	69,7
28	15,5	70,9	66,3
30 30	12,7	86,5	69,9
36	0	68,9	91,2
45	—	39,4	82,3
Durchschnittsprozent der lebenden Zellen	48,9	81,5	85,4

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Überblicken wir jetzt die Giftwirkungen der Erdalkalien, so sehen wir, daß die Wirkungsunterschiede im allgemeinen bei den Anionen besser hervortreten als bei den Kationen. Die folgende Tabelle gibt uns eine Übersicht über die Anionenwirkungen.

Übersichtstabelle
der Plasmakoagulation durch die Erdalkalien.

Pflanze	Kation	Konzentr. der Salze molar	Anionenreihen, mit dem wirksamsten Anion auf der ersten Stelle
Zebrina pendula .	Ca	0,15	$CNS > Br, C_2H_3O_2 > NO_3, Cl$ *)
Rotkraut	Ca	0,8	$CNS > Br > NO_3, C_2H_3O_2 > Cl$
Rhoeo discolor .	Mg	0,1—0,2	$Br > NO_3, Cl > C_2H_3O_2 > SO_4$
Rotkraut	Mg	0,8	$Br > C_2H_3O_2 > NO_3 > Cl > SO_4$
Rhoeo discolor .	Ba	0,1	$CNS > Br > Cl$
Rhoeo discolor .	Sr	0,2	$Br > NO_3, Cl$

*) Durch Kommata sind diejenigen Anionen abgetrennt, deren Wirkung einander nahe liegt.

Aus allen diesen Reihenfolgen können wir die folgende Mittelreihe ableiten:

$$CNS > Br > NO_3 > C_2H_3O_2 > Cl > SO_4$$ [1]).

Nicht ganz sicher ist die Stellung des Acetats, das in einigen Reihenfolgen vor dem Nitrat, in anderen nach ihm steht.

Im allgemeinen können wir es doch nach dem Nitrat stellen.

Die abgeleitete Anionenreihe ist die lyotrope und stimmt mit der Plasmakoagulationsreihe der Alkalisalze genau überein[2]).

Diese Tatsache berechtigt zu der Annahme, daß bei der Wirkung der Erdalkalien die physiologischen Verhältnisse ganz analog sind wie bei der der Alkalisalze.

In früheren Untersuchungen über die Wirkung der Alkalisalze auf das Pflanzenplasma kamen wir zu der Annahme, *daß die koagulierende (tödliche) Wirkung dieser Salze eine Folge ihres Vermögens ist, in die Zelle zu permeieren: Salze, die leicht eindringen, sind sehr giftig, die langsam eindringenden Salze sind dagegen verhältnismäßig unschädlich.*

Diese Giftwirkung der Salze ist direkt proportional ihrem Eindringungsvermögen. Das letztere ist ein physiko-chemischer Prozeß, für den in erster Linie die Kolloidaktivität der Salze maßgebend ist und die beiden Ionen eines Salzes von Bedeutung sind.

---

[1]) Bezieht sich nur auf die Mg-Salze.

[2]) Vgl. *Kaho*, diese Zeitschr. **117**, 87, 1921; **120**, 125, 1921; **128**, 284, 1921; **144**, 104, 1924; **151**, 102, 1924; „Über die physiologische Wirkung der Neutralsalze auf das Pflanzenplasma", Acta et Comm. Univ. Dorpat 1924, A. V., S. 4.

Für die Anionen der Alkalisalze (mit demselben Kation) gilt die lyotrope Reihenfolge:

$$J > Br > NO_3 > Cl > \text{Tartrat} > SO_4$$

als Permeabilitätsreihe; für die Kationen (mit demselben Anion):

$$K > Na > Li.$$

Die Ursache der verschiedenen Permeierfähigkeit der Alkalisalze ist ihr Vermögen, den kolloidalen Zustand der Plasmaoberflächenkolloide zu ändern.

Die Kationen wirken hier fällend (bzw. entquellend) auf die Plasmakolloide nach der Reihenfolge $K < Na < Li$, und dieses führt zu einer Verminderung der Permeabilität nach derselben Reihenfolge.

Die Anionen wirken peptisierend (quellend) auf das Plasma, und diese Wirkung führt zur Erhöhung der Permeabilität. Diese beiden Wirkungen der Anionen (die quellende und die permeabilitäterhöhende) verändern sich parallel und nehmen ab nach der Reihenfolge:

$$J > Br > NO_3 > Cl > \text{Tartrate} > SO_4.$$

Aus dem Gesagten folgt, daß das tatsächliche Eindringungsvermögen eines Alkalisalzes die algebraische Summe der entgegengesetzten kolloidchemischen Tendenzen der Ionen dieses Salzes darstellt.

Diese unsere Befunde wurden neuerdings durch *Ruhland* und *Hoffmann*[1]) bei Beggiatoa mirabilis in bester Weise bestätigt.

Alles oben für die Alkalisalze Angeführte gilt auch nach der Analogie für die Erdalkalien. Wir haben bei den beiden Gruppen der Salze genau dieselbe Giftigkeitsreihe; bei den Alkalisalzen:

$$CNS > J > Br > NO_3 > C_2H_3O_2 > Cl > \text{Tartrate} > \text{Citrate} > SO_4,$$

bei den Erdalkalien:

$$CNS > Br > NO_3 > C_2H_3O_2 > Cl > SO_4.$$

Für die Giftwirkung der Erdalkalikationen können wir folgende Reihenfolge aufstellen:

$$Mg > Ba > Sr > Ca;$$

doch sei hier betont, daß die Kationenwirkungen im allgemeinen weniger scharf ausgeprägt sind als die der Anionen.

Ferner sind alle Erdalkalien im allgemeinen in bezug auf das Pflanzenplasma weniger giftig als die Alkalisalze.

Daß die Giftwirkung auch bei den Erdalkalien in erster Linie von der Permeierbarkeit der Salze abhängig ist, wird durch folgende Tatsachen bewiesen.

---

[1]) *Ruhland* und *Hoffmann*, Arch. f. wiss. Bot. **1**, 1, 1925.

Tröndle[1]) fand, daß die Chloride der Erdalkalien durch die Wurzelzellen von Lupinus albus (Versuchsdauer 20 Minuten) nach folgender Reihe aufgenommen werden:

$$Mg > Ba > Sr > Ca.$$

Diese Reihenfolge stimmt mit der Giftigkeitsreihe genau überein.

Wir haben gezeigt[2]), daß, je besser ein Neutralsalz in die lebende Zelle eindringt, desto mehr die Temperatur der Hitzekoagulation des Plasmas durch dieses Salz herabgesetzt wird. Die Erdalkalien beeinflussen die Hitzegerinnung des Plasmas nach den Anionenreihenfolgen, die sehr gut mit den Giftigkeitsreihen übereinstimmen.

So ist die Hitzekoagulationstemperatur bei Gegenwart von Ca-Salzen (1,0mol.) beim Blütenblätterplasma von Viola tricolor folgende:

$Ca(CNS)_2$	$40,2^0$
$Ca(NO_3)_2$	$52,5^0$
$CaBr_2$	$53,7^0$
$CaCl_2$	$59,7^0$
$Ca(C_2H_3O_2)_2$	$61,5^0$

Bei Anwesenheit von Mg-Salzen:

$MgBr_2$	$59,1^0$
$Mg(NO_3)_2$	$61,3^0$
$MgSO_4$	$(62,7^0)$
$MgCl_2$	$64,4^0$
$Mg(C_2H_3O_2)_2$	$65,9^0$

Dabei ist zu bemerken, daß die saure Reaktion die Hitzekoagulation des Pflanzenplasmas fördert, die alkalische dagegen bis zu gewissem Grade hemmt[3]). Damit ist die abweichende Stellung der stark hydrolysierten Salze (Acetat alkalisch, $MgSO_4$ sauer) in den Hitzekoagulationsreihenfolgen zu erklären.

Ein direkter Nachweis der feinen Differenzen des Eindringungsvermögens verschiedener Erdalkalien läßt sich nicht leicht ausführen, da diese Salze sehr langsam eindringen[4]).

Zusammenfassend läßt sich über die physiologische Wirkung der Erdalkalien sagen, daß wir bei dieser Wirkung genau dieselben Verhältnisse haben wie bei den Alkalisalzen. Es war zu erwarten, daß hier infolge des zweiwertigen Kations die Anionenwirkung nicht zur Geltung kommt. Doch ist das nicht der Fall.

---

[1]) *A. Tröndle*, Sur la Permeabilité du protoplasme vivant pour quelques sels, Arch. des sciences phys. et nat. **45**, 38, 167, 1918.

[2]) *Kaho*, diese Zeitschr. **117**, 87, 1921; **151**, 102, 1924.

[3]) *W. Lepeschkin*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **28**, 99, 1910; *H. Kaho*, diese Zeitschr. **144**, 104, 1924.

[4]) Vgl. *H. Fitting*, Jahrb. f. wiss. Bot. **54**, 1, 1915; ferner *J. Spek*, Der Einfluß der Salze auf die Plasmakolloide von Actinoephaerium Eichhorni, Acta Zoologica 1921, S. 153.

Im Gegenteil ist die Anionenwirkung hier ebensogut ausgeprägt, wie bei den Alkalisalzen, und wie wir gesehen haben, für die Permeabilität und Giftwirkung ausschlaggebend.

Somit sind, wie für das Eindringungsvermögen, so auch für die Giftwirkung der Erdalkalien diese Ionenreihen maßgebend:

$$CNS > Br > NO_3 > C_2H_3O_2 > Cl > SO_4{}^{1)}$$

und

$$Mg > Ba > Sr > Ca,$$

wobei diese oder jene Eindringungsfähigkeit dieser Salze eine primäre Eigenschaft ist, die von ihrer Kolloidaktivität abhängt; die Giftwirkung aber eine Folge der Permeabilitätsverhältnisse.

Antagonistische Wirkung der Erdalkaliionen.

Bekanntlich wird angenommen, daß, wenn man zu einem in bezug auf das Pflanzenplasma giftigen Alkalisalz kleine Mengen eines die Giftigkeit vermindernden Erdalkalisalzes zusetzt, die entgiftende Wirkung nur dem zweiwertigen Erdalkalikation zukommt.

Da nun die Anionen dieser Salze, wie wir gesehen haben, einen großen Einfluß auf die physiologischen Prozesse ausüben, so kann man voraussetzen, daß sich der Einfluß der Anionen auch auf die antagonistische Wirkung erstreckt. Die Versuche bestätigen diese Voraussetzung in bester Weise.

Tabelle VII.

Salzgemische. Versuchspflanze Zebrina pendula. Temperatur 19°.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	Kontrollversuch 0,25 mol. KNO_3	0,25 mol. KNO_3			
		+ 0,065 mol. $Ca(CNS)_2$	+ 0,065 mol. $CaCl_2$	+ 0,065 mol. $MgBr_2$	+ 0,065 mol. $MgSO_4$
1h	84,8	100,0	100,0	90,5	100,0
1 30′	84,6	85,1	100,0	76,5	78,5
2	97,8	97,7	99,1	75,0	90,4
4	58,3	65,0	98,9	85,5	82,2
6	61,8	78,5	98,0	71,4	81,1
8	32,8	60,0	98,5	89,3	94,0
11	17,5	16,9	97,0	57,6	94,0
14	22,2	3,5	78,5	65,7	90,2
24	2,3	0	77,4	42,6	88,9
Durchschnittsprozent der lebenden Zellen	56,2	60,6	94,7	75,4	89,9

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

In der Tabelle VII sind zum Kaliumnitrat (0,25 mol.), das alle Schnitte von Zebrina pendula im Laufe von 24 Stunden abtötet, kleine Mengen von Calcium- und Magnesiumsalzen zugesetzt, wobei aus den

[1]) Bezieht sich nur auf die Mg-Salze.

zugefügten Salzen das eine [$Ca(CNS)_2$, $MgBr_2$] relativ besser in die Zelle eindringt als das andere ($CaCl_2$, $MgSO_4$). Wir sehen, daß das Calciumrhodanid keine entgiftende Wirkung hat, die Zellen sind nach 24 Stunden ebenso wie im Kontrollversuch alle abgestorben, während bei Anwesenheit von Calciumchlorid nach dieser Zeit über 70 Proz. von Zellen noch am Leben sind. Die zugesetzten Magnesiumsalze wirken beide antagonistisch, das Sulfat mehr als das Bromid.

Einen Überblick über die antagonistische Wirkung aller hier in Betracht kommenden Calciumsalze gibt uns die Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

Antagonistische Wirkung der Ca-Salze.

Versuchspflanze Zebrina pendula. Temperatur 20°.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	Kontrollversuch 0,262 mol. $NaNO_3$	0,262 mol. $NaNO_3$				
		+ 0,048 mol. $Ca(CNS)_2$	+ 0,048 mol. $Ca(NO_3)_2$	+ 0,048 mol. Ca-Acetat	+ 0,048 mol. $CaBr_2$	+ 0,048 mol. $CaCl_2$
1h	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4	87,4	97,4	93,0	100,0	100,0	100,0
6	54,5	69,2	92,9	100,0	86,3	76,3
8 30′	39,7	26,9	83,0	67,3	96,7	80,3
22	0	0	3,0	56,3	55,9	67,4
26	0	0	7,9	27,6	70,7	70,0
34	—	—	2,9	23,8	43,5	67,2
Durchschnittsproz. der lebenden Zellen	40,2	41,9	54,7	67,8	79,0	80,2

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

In der Tabelle VIII ist als giftiges Salz $NaNO_3$ (0,262 mol.) genommen. In seiner Lösung sterben die Schnitte nach etwa 10 Stunden ab. Zu diesem Salze sind verschiedene Calciumsalze zugesetzt, so daß jedesmal in der Lösung zwei Salze vorhanden sind: das giftige $NaNO_3$ und das entgiftende Calciumsalz. Die Konzentration des letzteren beträgt ungefähr ein Fünftel des giftigen Salzes.

Die Ergebnisse zeigen, daß die antagonistische Wirkung der Ca-Salze nach der lyotropen Reihenfolge:

$$CNS < NO_3 < C_2H_3O_2 < Br < Cl$$

steigt. Das Rhodanid hat auch hier ebenso wie im vorigen Versuch keine antagonistische Wirkung. Die letztere ist aber ganz deutlich beim Nitrat ausgeprägt und steigt allmählich bis zum Chlorid.

Vergleichen wir nun die Reihenfolge der antagonistischen Wirkung mit der Permeabilitäts- und Giftigkeitsreihenfolge $CNS > Br > NO$ $> C_2H_3O_2 > Cl$, so sehen wir, daß die beiden Anionenreihen fast vollständig übereinstimmen.

Abweichend verhält sich nur das Bromid, bei dem das Vermögen, antagonistisch zu wirken, größer ist, als man aus seiner Eindringungs-

fähigkeit schließen könnte. Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei diesem Salze in verdünnten Lösungen eine unbekannte ungünstige Nebenwirkung abgeschwächt wurde.

Tabelle IX.
Antagonistische Wirkung der Bariumsalze.
Versuchspflanze: Zebrina pendula. Temperatur 19°.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	Kontrollversuch 0,25 mol. $NaNO_3$	0,25 mol. $NaNO_3$		
		+ 0,0625 mol. $Ba(CNS)_2$	+ 0,0625 mol. $BaBr_2$	+ 0,0625 mol. $BaCl_2$
1h	100,0	100,0	100,0	100,0
3	100,0	100,0	100,0	100,0
5	91,1	100,0	100,0	100,0
7	92,3	97,2	100,0	100,0
10	66,6	72,2	96,8	99,1
12	54,8	55,0	99,4	92,8
24	7,9	0	44,3	53,3
28	0	—	9,5	12,3
Durchschnittsprozent der lebenden Zellen	64,1	65,5	81,2	82,2

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Bei den antagonistischen Wirkungen der Ba-Salze (Tabelle IX) haben wir etwa dieselben Verhältnisse wie bei den Ca-Salzen: das Rhodanid ist beinahe unwirksam, in den ersten Stunden ist eine sehr schwache entgiftende Wirkung zu bemerken, sie erlischt aber bald, und nach 24 Stunden ist die Giftwirkung des Gemisches sogar etwas stärker als die des Kontrollsalzes.

Das Bromid und Chlorid wirken deutlich antagonistisch, und zwar ziemlich gleich stark, das Chlorid vielleicht etwas stärker, doch liegt dieser Unterschied noch in den Grenzen des Versuchsfehlers.

Aus dem Vergleich der Reihenfolgen ergibt sich, ebenso wie im vorigen Versuch, daß die Reihenfolge der antagonistischen Ionen-

Tabelle X.
Antagonistische Wirkung der Sr-Salze.
Versuchspflanze: Zebrina pendula. Temperatur 21°.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	Kontrollversuch 0,2 mol. $NaNO_3$	0,2 mol. $NaNO_3$		
		+ 1/17 mol. $SrBr_2$	+ 1/17 mol. $Sr(NO_3)_2$	+ 1/17 mol. $SrCl_2$
1h	100,0	100,0	100,0	100,0
3	97,7	96,1	99,2	99,0
7	10,1	53,9	82,9	60,5
9	11,6	58,2	27,1	71,0
12	21,4	52,5	37,0	39,3
24	0	8,4	30,0	21,2
Durchschnittsprozent der lebenden Zellen	40,1	61,5	62,7	65,1

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

wirkungen CNS < Br, Cl die umgekehrte Permeabilitäts-[1]) bzw. Giftigkeitsreihe ist.

Alle untersuchten Sr-Salze (Tabelle X) haben eine ausgesprochene antitoxische Wirkung, die Differenzen der Anionenwirkungen sind hier etwas weniger deutlich, doch ist das Bromid nicht so aktiv als das Nitrat und Chlorid. Die Reihenfolge der antagonistischen Wirkung lautet: Br < NO_3, Cl.

Alles in allem sehen wir, daß bei den Erdalkalien die antagonistische Wirkung nicht nur vom Kation abhängig ist, die Anionen spielen hier ebenso eine bedeutende Rolle; diese Wirkung setzt sich additiv, wie auch das Eindringungsvermögen, aus den entgegengesetzten Wirkungen beider Ionen zusammen: die Kationen setzen die Permeabilität einer Zelle nach der Reihenfolge:

$$(\text{Alkalikationen}) < \text{Mg} < \text{Ba} < \text{Sr} < \text{Ca}$$

herab, die Anionen fördern sie nach der Reihe:

$$\text{CNS} > \text{Br} > \text{NO}_3 > \text{Acetat} > \text{Cl} > \text{SO}_4;$$

die Permeierfähigkeit und antitoxische Wirkung eines Erdalkalisalzes (analog wie bei den Alkalisalzen) sind umgekehrt proportional zueinander: je mehr ein Salz selbst in das Plasma eindringt (je giftiger es ist!), desto kleiner ist seine Entgiftungskraft den anderen Salzen gegenüber und umgekehrt.

Wir haben früher gezeigt[2]), daß *Salze, die entgiftend wirken, immer das abnorme Eindringen des giftigen Salzes herabdrücken und eine mehr oder weniger normale Permeabilität wieder herstellen.* Somit ist die sogenannte antagonistische Ionenwirkung ein Permeabilitätsproblem.

Wenn z. B. das zum Na-Nitrat zugesetzte Ca-Chlorid die Giftigkeit des ersteren Salzes vermindert, so erklärt sich das dadurch, daß der Gleichgewichtszustand der Hydratation der Plasmakolloide durch die entquellende Wirkung der Kationen $Na^+ + Ca^{++}$ und durch die quellende der Anionen $NO_3^- + Cl^-$ dem Plasma gegenüber günstiger ist als der durch das $NaNO_3$ allein bewirkte kolloide Zustand, welcher durch eine abnorme Quellung der Plasmakolloide und demzufolge durch ein physiologische Grenzen weit übersteigendes Eindringen des Salzes gekennzeichnet ist. Wird statt des $CaCl_2$ $Ca(CNS)_2$ zugesetzt, so wird durch die hohe quellende Wirkung des Anions CNS^- das ungünstige Hydratationsgleichgewicht sehr wenig verändert und das Salz hat keine merkliche antitoxische Wirkung.

---

[1]) Vgl. *Kaho*, diese Zeitschr. **151**, 102, 1924.
[2]) Diese Zeitschr. **123**, 284, 1921.

Zusammenfassung.

1. Läßt man auf die Pflanzenzellen verschiedene Salze alkalischer Erden in solchen Konzentrationen und in solcher Dauer einwirken, daß das Plasma in kurzer Zeit getötet (koaguliert) wird, so tritt dabei eine deutliche Anionenwirkung hervor, die im Prinzip mit derjenigen der Alkalisalze vollständig übereinstimmt.

2. Für die Permeabilität und die Plasmakoagulation sind folgende Ionenreihen maßgebend:

$$Mg > Ba > Sr > Ca$$

und

$$CNS > Br > NO_3 > C_2H_3O_2 > Cl > SO_4$$ [1]).

3. Die antagonistische (entgiftende) Wirkung der Erdalkalien, die übrigens ein Permeabilitätsphänomen darstellt, ist umgekehrt proportional dem Eindringungsvermögen bzw. der Giftwirkung dieser Salze. Für sie gelten die unter 2. angeführten Ionenreihen in umgekehrter Richtung.

---

[1]) Bezieht sich auf die Mg-Salze.

Der Alkaligehalt des Blutserums gesunder und kranker Kinder.

Von

Josef Csapó.

(Aus der mit dem Stefanie-Kinderspital in Verbindung stehenden Universitäts-Kinderklinik in Budapest.)

(Eingegangen am 10. Oktober 1925.)

Im vorigen Jahre bestimmte ich den diffusiblen Alkaligehalt des Blutserums[1]). Die Untersuchungen ergaben folgende Resultate: 1. Aus dem Blutserum diffundiert nicht nur das freie, sondern auch ein Teil des an die Eiweißkörper gebundenen Alkalis; 2. der diffusible Alkaligehalt des Blutserums ist die Funktion des Eiweißgehaltes und des Dispersitätsgrades der Eiweißkörper. Die vorliegenden Untersuchungen bezwecken einen weiteren Schritt in der Kolloidchemie des Blutserums. Die zu lösende Aufgabe lautet folgendermaßen: 1. Wie groß ist der Gesamtalkaligehalt des Blutserums? 2. Ist ein Parallelismus zwischen Alkali- und Eiweißgehalt des Blutserums festzustellen?

Der Gesamtalkaligehalt des Blutserums wurde zuerst durch *Róna* und *György*[2]) mittels Ultrafiltration genau bestimmt. Genannte Autoren haben 50 ccm Pferdeserum mit destilliertem Wasser auf das vierfache Volumen verdünnt, mit einem CO_2-Druck von 8 Atmosphären ultrafiltriert und eine bekannte Menge des eiweißfreien Filtrats mit n/10 HCl zurücktitriert. Diese Methode erfordert aber ein so großes Quantum Blutserum, daß ich an Serienuntersuchungen bei Kindern mit der erwähnten Methode gar nicht denken konnte. Es schien also notwendig, eine Methode auszuarbeiten, welche höchstens 2 bis 3 ccm Serum erfordert und uns doch brauchbare Werte über den Alkaligehalt des Blutserums gibt. Es lag am nächsten, eine Mikroultrafiltration ein-

---

[1]) *Csapó*, Jahrb. f. Kinderheilk. 108, 112, 1925.

[2]) *Róna* und *György*, diese Zeitschr. 56, 416, 1913.

zuführen. Da ich über eine Mikroapparatur nicht verfügte, gebrauchte ich eine andere Methode. Auch bei dieser Untersuchungsserie wurde gerade so verfahren, wie ich es bei der Bestimmung des diffusiblen Alkalis beschrieben hatte, nun machte ich aber eine kleine Änderung. Die Dialyse wurde nämlich nicht unter Paraffin, sondern in CO_2-Atmosphäre ohne Paraffin ausgeführt. Das an die Eiweißkörper gebundene Alkali kann durch Zugabe einer Säure frei gemacht werden. Zu dem Zwecke schien mir die CO_2 am geeignetsten. Die CO_2 ist eine stärkere Säure als die Serumeiweißkörper, das an die Eiweißkörper gebundene Alkali wird durch die CO_2 entzogen, dabei bildet sich $NaHCO_3$, welches die Wand der Dialysierhülse im Gegensatz zu den nicht diffusiblen Eiweiß-Natriumverbindungen leicht passiert. Die CO_2 ist außerdem eine flüchtige Säure, welche aus dem dialysierten Blutserum rasch entweicht und im weiteren Gange der Methode gar nicht stört.

Methodik.

Ich bestimmte zuerst die Säurebindung von 1 ccm Blutserum nach der mit *Bosányi*[1]) gemeinsam beschriebenen Methode und den Eiweißgehalt mit dem Refraktometer nach *Pulfrich*. Gleichzeitig setzte ich 1 ccm Blutserum in eine 100 mm hohe, 16 mm breite Diffusionshülse von *Schleicher* u. *Schüll* und dialysierte in eine große Eprouvette von 150 ccm Inhalt gegen destilliertes Wasser 4 Tage hindurch unter dem Druck von 1 Atm. CO_2. Die Eprouvette wurde mit einem doppelt gebohrten Gummistopfen gut verschlossen. Durch die eine Bohrung führte ein langes, mit eingeschliffenem Hahn versehenes Glasrohr zwecks Einleitung der CO_2, durch die andere Bohrung ein kurzes Glasrohr mit eingeschliffenem Hahn zwecks Entweichung der Luft. Die Dialysierhülse wurde im Inneren der Eprouvette mit einem Glasring festgehalten. Der ganze Dialysationsapparat stand fortwährend im Eisschranke, und sowohl das destillierte Wasser wie die CO_2 erneuerte ich zweimal täglich. Nach 4 Tagen bestimmte ich die Säurebindung des dialysierten Serums. Das genaue Verfahren ist bei Bestimmung des diffusen Alkalis angegeben. Die Differenz zwischen der Säurebindung des nativen und in CO_2-Atmosphäre dialysierten Blutserums ergab die aus 1 ccm Blutserum herausdiffundierte Alkalimenge. Diese Alkalimenge wurde mit dem Eiweißprozent dividiert und, um die Ergebnisse auf 100 ccm Serum zu beziehen, mit 100 multipliziert. Dadurch erhielt ich einen Alkali-Eiweißquotienten, welcher bedeutet: wieviel Kubikzentimeter Alkali fällt auf 1 Proz. Eiweiß in 100 ccm Blutserum, ausgedrückt in n/50 Lauge. Es wäre wünschenswert gewesen, dieses Verfahren mit Mikroultrafiltration zu vergleichen. Ich war aber nicht in der Lage, dies durchzuführen, da mir, wie ich oben erwähnt habe, keine Apparatur zur Verfügung stand.

Der Alkaligehalt des Blutserums wurde bei 12 gesunden und 24 kranken Kindern bestimmt.

---

[1]) *Bosányi* und *Czapó*, diese Zeitschr. **158**, 185, 1924.

Ergebnis.

1. Gesunde Kinder.

Nr.	Eiweiß Proz.	Der Alkaligehalt von 1 ccm Blutserum ccm	Quotient
1	8,06	2,61	32
2	7,48	2,40	32
3	9,14	2,72	29,8
4	8,20	2,54	31,0
5	7,27	2,27	31,2
6	7,92	2,34	29,5
7	7,42	2,21	29,8
8	7,63	2,33	30,5
9	8,28	2,35	28,4
10	7,50	2,14	28,5
11	8,28	2,32	28,0
12	8,71	2,45	27,5

2. Kranke Kinder.

Nr.	Diagnose	Eiweiß Proz.	Der Alkaligehalt von 1 ccm Blutserum ccm	Quotient
1	Tuberculosis pulmonum . . .	9,05	2,05	22,6
2	" " . . .	7,63	1,88	24,6
3	" " . . .	8,71	2,24	25,7
4	" " . . .	8,71	1,98	22,7
5	" " . . .	8,03	1,92	23,9
6	" " . . .	8,90	1,86	20,9
7	Spondylitis dorsalis	9,21	1,93	20,9
8	Hyperplasia gland. peribronch.	8,92	2,36	26,4
9	Peritonitis tuberculosa	9,14	2,70	29,5
10	Pleuritis exsudativa	8,37	2,18	26,0
11	" "	8,49	2,08	24,5
12	Appendicitis	8,06	2,03	25,1
13	"	8,78	2,13	24,2
14	"	8,58	2,33	27,1
15	Pyelocystitis	8,92	1,98	22,2
16	"	8,28	2,38	28,7
17	Malaria	8,46	2,48	29,3
18	"	6,98	2,28	32,6
19	Typhus abdominalis	6,70	1,98	29,5
20	Encephalitis	8,58	2,57	29,9
21	Chorea minor	8,35	2,51	30,0
22	Osteochondrosarcom operiert .	7,42	2,21	29,7
23	Icterus hämolyticus	7,09	2,14	30,1
24	Anämia	7,11	1,95	27,4

Aus der ersten Tabelle ist ersichtlich, daß sich der Alkaligehalt des Blutserums bei gesunden Kindern dem Eiweißgehalt entsprechend zwischen weiten Grenzen bewegt, der niedrigste Wert ist 2,14 ccm, der höchste 2,72 ccm, der Mittelwert 2,40 ccm. Der Alkaligehalt des Blutserums ist also eine Funktion des Eiweißgehaltes. Der Alkali-Eiweiß-

quotient schwankt zwischen 27,5 bis 32. Der nach dieser Methode festgestellte Gesamtalkaligehalt (freie + an die Eiweißkörper gebundene) von 1 ccm Blutserum ist mit 2,4 ccm n/50 bzw. 4,8 ccm n/100 Lauge äquivalent, in 100 ccm Blutserum fallen aus dieser Alkalimenge auf 1 Proz. Eiweiß im Mittel 30 ccm n/50, bzw. 60 ccm n/100 Lauge. Der Alkalinitätsgrad des Blutserums entspricht nach diesen Angaben einer 0,048 n Lauge. Ich glaube, daß ein Teil des an die Eiweißkörper gebundenen Alkalis trotz der langen Dialyse (in CO_2-Atmosphäre) in der Diffusionshülse zurückbleibt und die Werte etwas niedriger ausfallen wie jene, die man mit der Ultrafiltration hätte erhalten können. Diese die Wand der Diffusionshülse nicht passierende Alkalimenge kann aber höchstens einen geringen Bruchteil des Gesamtalkalis bilden.

Die wahre Reaktion des Blutserums ist trotz des hohen Alkaligehaltes fast neutral. Diese Reaktionseigentümlichkeit verdankt das Blutserum einerseits den Proteinen, andererseits der CO_2. Nach den Untersuchungen von *Rohonyi*[1]) beträgt der freie Alkaligehalt von 1 ccm Serum bzw. Plasma 1,4 ccm n/100 Lauge. Die starke alkalische Reaktion, welche diese Laugenmenge als $NaOH$ hervorrufen würde, wird durch die CO_2 abgestumpft. Die Natronlauge bildet mit der CO_2 $NaHCO_3$, welch letzteres dem Blutserum eine schwach alkalische Reaktion verleiht. Nach den Ergebnissen dieser Diffusionsmethode ist der Gesamtalkaligehalt von 1 ccm Blutserum mit 4,8 ccm n/100 Lauge äquivalent. Nehmen wir an, daß aus dem Blutserum das Eiweiß und die CO_2 vollständig fehle, dann würde die wahre Reaktion des Blutserums mit der einer 0,048 n Lauge gleich sein. Die starke alkalische Reaktion wird aber einerseits durch die CO_2, andererseits, und zwar im größten Teile, durch die Proteine geschwächt. Von den in 1 ccm Serum befindlichen 4,8 ccm n/100 Lauge paralysiert die CO_2 betreffs Alkalinität nur 1,4 ccm, während die Proteine 3,4 ccm paralysieren. Den Proteinen ist also im Blutserum eine größere reaktionsmildernde Wirkung zuzuschreiben als der CO_2. Der freie Alkaligehalt des Serums ($NaHCO_3$) hängt bei gesunden Individuen von der CO_2-Tension, der gebundene Alkaligehalt (Eiweiß-Natrium) von der Eiweißmenge ab. Sowohl die beiden ersteren wie die beiden letzteren stehen miteinander im engsten Zusammenhang, sie verändern sich parallel, sonst würde die wahre Reaktion des Blutserums die physiologischen Schwankungsgrenzen bedeutend übertreten.

Die Tabelle der kranken Kinder zeigt uns klar, daß der mit der Diffusionsmethode feststellbare Alkaligehalt und der Alkali-Eiweißquotient bei Tuberkulose, Pleuritis, Appendicitis geringer ist als bei gesunden Kindern. Auch in einem Falle von Pyelocystitis waren die

[1]) *Rohonyi*, Münch. med. Wochenschr. 50, 1920.

erhaltenen Werte der Tuberkulose usw. ähnlich. Es fragt sich nun, worin die Ursache der Erniedrigung des Alkaligehaltes des Blutserums liegt? Ist er tatsächlich erniedrigt oder ist die CO_2 bei Tuberkulose, Pleuritis usw. nicht imstande, das an die Eiweißkörper gebundene Alkali in dem Maße frei zu machen, als wir es bei gesunden Kindern erfuhren? Es bildet sich vielleicht eine gewisse Alkaliretention in der Diffusionshülse, welche sich der Bestimmung vollkommen entzieht? Eine Herabsetzung der Alkalimenge des Blutserums kann aus zwei Gründen erfolgen: 1. Wegen der Verminderung des Bicarbonatgehaltes, 2. wegen der Verminderung des gebundenen Alkaligehaltes (Eiweiß-Natrium). Den erhaltenen Werten ähnliche Schwankungen kommen im Bicarbonatgehalt nicht vor. Dieser Befund kann also allein aus der Schwankung des Bicarbonatgehaltes des Blutserums nicht erklärt werden. Wir müssen auch nach anderen Ursachen suchen. Es ist auffallend, daß die Verminderung des Alkaligehaltes des Blutserums gerade bei denjenigen Krankheiten vorkommt, welche gewöhnlich mit einer Globulinvermehrung einhergehen. Vom kolloidchemischen Gesichtspunkt aus sind wieder zwei Faktoren in Betracht zu ziehen. Erstens ist es möglich, daß die Laugenbindungsfähigkeit der Globuline geringer ist als die der Albumine. Werden also im Blutserum die Globuline auf Kosten der Albumine vermehrt, so vermindert sich die an die Eiweißkörper gebundene Alkalimenge, dies kommt wieder in der Herabsetzung des Gesamtalkaligehaltes des Blutserums zum Ausdruck. Es kann aber auch eine andere Möglichkeit nicht vollständig abgelehnt werden. Wir wissen, daß die Globuline einen stärkeren Säurecharakter aufweisen als die Albumine. Durch stärkere Säure wird die Lauge fester gebunden, die Wirksamkeit der CO_2 ist vielleicht bei den Globulin-Natriumverbindungen gering. Die CO_2 mag aus den Globulin-Natriumverbindungen das Alkali nicht in dem Maße frei zu machen als aus den Albumin-Natriumverbindungen. Im Falle einer Globulinvermehrung wird in der Diffusionshülse mehr Alkali retiniert, als wenn sich der Albumin-Globulinquotient normal verhält. Der Alkaligehalt ist nach der letzten Annahme nur scheinbar vermindert, vielmehr ist die Alkaliherabsetzung einem methodischen Fehler zuzuschreiben. Die erwähnten Fragen sind noch nicht experimentell entschieden, dies wird nur dann möglich sein, wenn reine, alkalifreie Proteine in dieser Hinsicht einer gründlichen Untersuchung unterzogen werden.

Bei anderen Erkrankungen wurde bei zwei schon in Heilung befindlichen Malarien, bei einem Typhus abdominalis, Chorea minor, Osteochondrosarcom (operiert), Icterus haemolyticus, Anaemie keine Abweichung von dem Normalwert gefunden.

Mikromethode der Amylasebestimmung.

Von

W. Engelhardt und M. Gertschuk.

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 12. Oktober 1925.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Bei experimentellen und klinischen Untersuchungen wird für die Amylasebestimmung meistens die Methode von *Wohlgemuth* (1) angewandt, welche durch ihre relative Einfachheit und Schnelligkeit gekennzeichnet wird. Jedoch besitzt sie auch manchen Nachteil: Erstens wird dabei nur das Verschwinden der Jodreaktion berücksichtigt, während biologisch die Zuckerbildung viel wichtiger ist; diese zwei Prozesse verlaufen bei weitem nicht immer parallel und werden durch äußere Einflüsse bisweilen in gerade entgegengesetztem Sinne beeinflußt [vgl. *Holmbergh* (2)]. Zweitens ist die Genauigkeit der Methode nicht sehr groß. Sicher kann der Endpunkt nur bei groben Abstufungen der Reihe bestimmt werden; bei feineren Abstufungen fallen die individuellen Schwankungen bei der Farbenschätzung zu schwer ins Gewicht.

Speziell für die Amylasebestimmung im Blute scheint die Methode wenig geeignet — sie erfordert bedeutende Mengen Serums (als Blut berechnet also noch doppelt so viel) —, es wird auch die Bestimmung dadurch erschwert, daß die Proteine des Serums nicht unbeträchtliche Mengen Jod binden. Als Hauptnachteil bleibt aber auch hier die ungenügende Genauigkeit der Bestimmung.

Wir suchten deshalb eine Methode auszuarbeiten, die kleine Mengen Ausgangsmaterial erfordert und bei möglichster Einfachheit genügend genaue quantitative Resultate ergibt. Dabei sollte nicht die Depolymerisation der Stärke, sondern ihre Verzuckerung ins Auge genommen werden.

Die neuerdings vorgeschlagenen nephelometrischen Methoden von *Rona* und *Eweyk* (3) und von *Paechtner* (4) lassen wohl kaum zu wünschen, was Einfachheit und Genauigkeit betrifft. Doch setzen sie die Anwendung eines recht teueren Instrumentes — eines Nephelometers oder Dubosq-

kolorimeters — voraus, auch ist das Substrat nicht so leicht im gewünschten Reinheitsgrad zugänglich. Für eine Mikromethodik, besonders für die Bestimmung der Blutamylase, ist das Prinzip wahrscheinlich überhaupt nicht anwendbar.

In der Literatur konnten wir nur in der Arbeit von *Fyfe* (5) einen Versuch auffinden, eine derartige Methodik auszuarbeiten. (Wir sehen hier von den ziemlich zahlreichen Arbeiten ab, wo größere Mengen — mehrere Kubikzentimeter — Blut bzw. Serum angewandt wurden.) Der genannte Autor stellte seine Versuche so an, daß zwei Blutproben zu je 0,2 ccm mit 1 ccm 0,1 proz. Stärkelösung versetzt wurden, in der einen der Zuckergehalt sofort, in der anderen nach ½ stündigem Verweilen im Thermostaten nach *Mc Lean* bestimmt wurde. Die Differenz gab die von der Amylase gebildete Zuckermenge an. Leider führt der Autor keine Daten über die Genauigkeit seiner Methode an, auch nicht über die Proportionalität zwischen Fermentmenge und Stärkeabbau; es wird auch nicht für die Erhaltung einer geeigneten [H˙] gesorgt. Außerdem sind auch hier die erforderlichen Blutmengen nicht sehr gering — 0,4 ccm aus einem Fingerstich zu gewinnen, ist nicht leicht und für den Patienten recht schmerzhaft[1]).

Wir stellten uns die Aufgabe, mit möglichst k'einen Blutmengen zu arbeiten. Als solche Blutmenge wählten wir 20 cmm, wie sie bei der überall gebräuchlichen Hämoglobinbestimmung nach *Sahli* entnommen wird. Von dieser Blutmenge ausgehend, wurden alle übrigen Bedingungen untersucht, um die optimalen Verhältnisse aufzufinden und somit die größten Ausschläge und auch die höchste Genauigkeit zu erzielen. Zur Zuckerbestimmung wurde die außerordentlich exakte und zuverlässige Methode von *Hagedorn-Jensen* (6) angewandt. Alle Vorversuche wurden mit Kaninchenblut ausgeführt. Die Zahlen der Tabellen bedeuten stets die Mengen reduzierenden Zuckers, als Glucose berechnet.

I. Einfluß der Substratkonzentration bei variierten Fermentmengen.

Es mußte von der Methode verlangt werden, daß die während der Versuchszeit gebildeten Zuckermengen zu den vorhandenen Fermentmengen in einem bestimmten Verhältnis stehen, am besten derart, daß sie ihnen direkt proportional seien. Eine derartige Proportionalität besteht bekanntlich nur bei einem gewissen Verhältnis zwischen Enzym- und Substratmengen. Die erste Aufgabe war daher, dieses günstigste Verhältnis festzustellen.

0,5 ccm Kaninchenblut werden mit 24,5 ccm destillierten Wassers verdünnt. Von dieser Lösung werden fallende Mengen, 7,5, 5, 3,75 und

[1]) Anmerkung bei der Korrektur. Als vorliegende Arbeit bereits im Druck war, erschien die Arbeit von *L. Lorber* (diese Zeitschr. **163**, 480, 1925), der ebenfalls eine Mikromethode zur Amylasebestimmung vorschlägt. Es gelten bezüglich dieser Arbeit dieselben Bedenken, welche gegenüber der Arbeit von *Fyfe* hervorgehoben worden sind.

Tabelle I.

Es wird die Blutmenge von 20 cmm und die ihr entsprechende Zuckermenge zu 100 Proz. gesetzt.

a) Stärke 5 mg pro Versuch, 1 mg pro Bestimmung. Ohne Pufferzusatz.

Blutmenge		Sofort		Nach 1 Stunde				Nach 2 Stunden				Nach 3 Stunden			
		Thiosulfat	Zucker	Thiosulfat	Zucker			Thiosulfat	Zucker			Thiosulfat	Zucker		
					Gesamtmenge	Differenz			Gesamtmenge	Differenz			Gesamtmenge	Differenz	
cmm	Proz.		mg		mg	mg	Proz.		mg	mg	Proz.		mg	mg	Proz.
10	50	1,81	0,032	1,52	0,084	0,052	69	1,27	0,129	0,097	85	1,19	0,143	0,111	92
15	75	1,73	0,047	1,36	0,113	0,066	88	1,14	0,152	0,105	92	1,05	0,168	0,121	100
20	100	1,68	0,056	1,26	0,131	0,075	100	1,04	0,176	0,114	100	1,00	0,177	0,121	100
30	150	1,62	0,066	1,12	0,155	0,089	119	0,96	0,184	0,118	103	0,85	0,204	0,138	114

b) Stärke 7,5 mg pro Versuch, 1,5 mg pro Bestimmung. Ohne Pufferzusatz.

Blutmenge		Sofort		Nach 1 Stunde				Nach 2 Stunden				Nach 3 Stunden			
		Thiosulfat	Zucker	Thiosulfat	Zucker			Thiosulfat	Zucker			Thiosulfat	Zucker		
					Gesamtmenge	Differenz			Gesamtmenge	Differenz			Gesamtmenge	Differenz	
cmm	Proz.		mg		mg	mg	Proz.		mg	mg	Proz.		mg	mg	Proz.
10	50	1,71	0,050	1,52	0,084	0,034	47	1,35	0,115	0,065	48	1,08	0,163	0,113	61
15	75	1,69	0,054	1,40	0,106	0,052	72	1,13	0,154	0,100	73	0,85	0,204	0,150	81
20	100	1,66	0,059	1,26	0,131	0,072	100	0,90	0,195	0,136	100	0,63	0,245	0,186	100
30	150	1,6	0,070	1,11	0,157	0,087	121	0,65	0,241	0,171	126	0,39	0,292	0,222	119

c) Stärke 10 mg pro Versuch, 20 mg pro Bestimmung. Ohne Pufferzusatz.

Blutmenge		Sofort		Nach 1 Stunde				Nach 2 Stunden				Nach 3 Stunden			
		Thiosulfat	Zucker	Thiosulfat	Zucker			Thiosulfat	Zucker			Thiosulfat	Zucker		
					Gesamtmenge	Differenz			Gesamtmenge	Differenz			Gesamtmenge	Differenz	
cmm	Proz.		mg		mg	mg	Proz.		mg	mg	Proz.		mg	mg	Proz.
10	50	1,78	0,038	1,56	0,077	0,039	57	1,38	0,110	0,072	57	1,21	0,139	0,101	54
15	75	1,76	0,041	1,45	0,097	0,056	82	1,21	0,139	0,098	78	0,90	0,195	0,154	82
20	100	1,73	0,047	1,35	0,115	0,068	100	1,02	0,173	0,126	100	0,69	0,234	0,187	100
30	150	1,67	0,057	1,16	0,148	0,091	134	0,67	0,238	0,181	144	0,40	0,290	0,233	122

d) Stärke 15 mg pro Versuch, 3 mg pro Bestimmung. Ohne Pufferzusatz.

Blutmenge		Sofort		Nach 1 Stunde				Nach 2 Stunden				Nach 3 Stunden			
		Thiosulfat	Zucker	Thiosulfat	Zucker			Thiosulfat	Zucker			Thiosulfat	Zucker		
					Gesamtmenge	Differenz			Gesamtmenge	Differenz			Gesamtmenge	Differenz	
cmm	Proz.		mg		mg	mg	Proz.		mg	mg	Proz.		mg	mg	Proz.
10	50	1,67	0,057	1,47	0,093	0,036	51	1,26	0,131	0,074	47	0,94	0,188	0,131	55
15	75	1,65	0,061	1,34	0,117	0,056	79	1,04	0,170	0,109	70	0,64	0,243	0,182	77
20	100	1,64	0,063	1,24	0,134	0,071	100	0,77	0,219	0,156	100	0,35	0,300	0,237	100
30	150	1,54	0,081	0,91	0,193	0,112	158	0,39	0,292	0,211	135	—	—	—	—

2,5 ccm, in vier kleine Kolben abgemessen und dazu je 5 ccm 0,25proz. NaCl-Lösung, 5 ccm 2proz. NaF-Lösung (als Antiseptikum) und Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 20 ccm gegeben. Nach Zusatz von je 5 ccm Stärkelösung wird gut durchgemischt und den Gemischen sofort je 5 ccm zur Zuckerbestimmung entnommen, worauf die Kolben verkorkt und in den Thermostaten bei 37° gestellt werden. Jede Stunde werden überall weitere Proben zu 5 ccm entnommen und darin der Zuckergehalt bestimmt. Jede Probe entspricht 30, 20, 15 bzw. 10 cmm Blut. Die sofort nach dem Ansatz entnommene Probe gibt den ursprünglichen Zuckergehalt an. Er setzt sich aus dem Blutzucker und den stets der Stärke beigemengten reduzierenden Substanzen zusammen. Die Zuckerbestimmung geschah genau nach der Vorschrift von *Hagedorn-Jensen*: Proteinfällung mit Zinkhydroxyd im Wasserbad, Filtrieren durch gut ausgewaschene Watte usw. Sämtliche Versuche wurden mit *Merck*scher löslicher Stärke ausgeführt. Wie uns speziell angestellte Versuche zeigten, hängt die Zuckerbildung wenig von der Stärkesorte ab; wir erhielten z. B. bei einem Versuch mit drei verschiedenen Stärkesorten — von *Kahlbaum*, von *Merck* und vom Russischen Reichsgeschäft für Laboratoriumsbedarf — genau die gleichen Zuckermengen. Dagegen enthalten die verschiedenen Stärkesorten verschiedene Mengen reduzierender Substanzen beigemengt. Diese Eigenreduktion der Stärke ist am höchsten bei der *Kahlbaum*schen: 3 mg geben eine Reduktion entsprechend 0,111 mg Glucose; 3 mg *Merck*sche Stärke entsprechen 0,031 mg, und 3 mg russischer Stärke 0,020 mg Zucker.

Wie aus den Zahlen der Tabelle I zu ersehen ist, besteht bereits bei Anwendung von 2 mg Stärke eine befriedigende Proportionalität zwischen den jeweiligen Fermentmengen und den gebildeten Zuckermengen. Wir hielten es aber für wünschenswert, die Substratkonzentration etwas höher zu nehmen, nämlich 3 mg für jede Bestimmung. Die Abhängigkeit der gebildeten Zuckermenge von der Substrat-

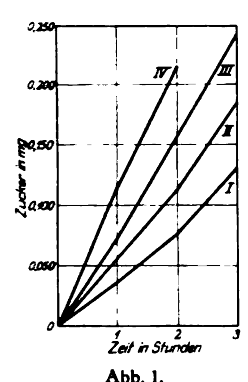


Abb. 1.
I 10 cmm Blut. II 15 cmm Blut.
III 20 „ „ IV 30 „ „

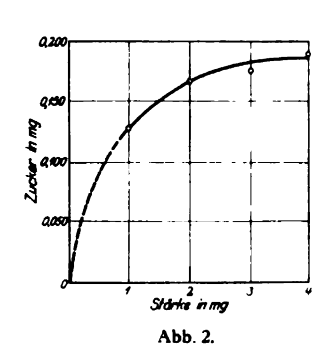


Abb. 2.

konzentration bei konstanter Fermentmenge ist aus Tabelle II und Abb. 2 zu ersehen. Der zeitliche Verlauf der Stärkespaltung ist in Abb. 1 wiedergegeben; die Zahlen hierzu sind der Tabelle Id entnommen.

Tabelle II.

Blutmenge 20 cmm. Endkonzentration an NaCl und NaF 0,05 bzw. 0,2 Proz. Ohne Pufferzusatz.

Stärke für jede Bestimmung mg	Sofort		Nach 2 Stunden		
	Thiosulfat	Zucker mg	Thiosulfat	Zucker Gesamtmenge mg	Zucker Differenz mg
1	1,84	0,027	1,11	0,157	0,130
2	1,76	0,041	0,82	0,209	0,168
3	1,73	0,047	0,73	0,226	0,178
4	1,65	0,061	0,60	0,251	0,190

II. p_H-Optimum der Blutamylase.

Um das p_H-Optimum festzustellen, wurden folgende Versuche angestellt:

In fünf Kolben von 50 ccm Inhalt gelangen je 5 ccm Kaninchenblut in Verdünnung 1 : 50; 5 ccm einer NaCl-NaF-Lösung, enthaltend 0,5 Proz. NaCl und 2 Proz. NaF; 10 ccm m/15 Phosphatpuffer; zuletzt 5 ccm 0,3 proz. Stärkelösung. Es werden zur Bestimmung 5 ccm entnommen und in Probierröhrchen übertragen; letztere enthalten so bemessene Mengen primärer bzw. sekundärer Phosphatlösung, daß beim Vermischen mit der Probe stets p_H 6,7 resultiert. Es werden 5 ccm 0,45 proz. $ZnSO_4$ und 1 ccm n/10 NaOH zugesetzt und auf 3 Minuten ins Wasserbad gestellt. Zuckerbestimmung wie gewöhnlich. Sorgt man nicht für ein geeignetes p_H bei der Proteinfällung, so kann letztere mißlingen.

Tabelle III.

Versuch 1.

p_H	Sofort		Nach 1 Stunde			Nach 2 Stunden			Nach 3 Stunden		
	Thiosulfat	Zucker mg	Thiosulfat	Zucker Gesamtmenge mg	Zucker Differenz mg	Thiosulfat	Zucker Gesamtmenge mg	Zucker Differenz mg	Thiosulfat	Zucker Gesamtmenge mg	Zucker Differenz mg
Ohne Puffer	1,69		1,41	0,104	0,048	1,14	0,152	0,096	0,99	0,179	0,123
5,5	1,70		1,49	0,090	0,034	1,30	0,124	0,068	1,28	0,127	0,071
6,1	1,68		1,36	0,113	0,057	1,07	0,164	0,108	0,95	0,186	0,130
6,7	1,67		1,35	0,115	0,059	1,00	0,177	0,121	0,83	0,208	0,152
7,3	1,68		1,39	0,108	0,052	1,11	0,157	0,101	0,97	0,182	0,126
Mittel	1,68	0,056									

Versuch 2.

Ansatz wie oben, jedoch als Antisepticum wurde anstatt NaF Toluol angewandt. NaCl-Endkonzentration 0,1 Proz. Puffergemische nach *Clark* hergestellt, aus m/10 K_2HPO_4 und n/10 NaOH. Vor der Proteinfällung stets auf p_H 6,8 gebracht.

p_H	Sofort		Nach 1 Stunde			Nach 2 Stunden		
	Thiosulfat	Zucker mg	Thiosulfat	Zucker Gesamtmenge mg	Zucker Differenz mg	Thiosulfat	Zucker Gesamtmenge mg	Zucker Differenz mg
5,8	1,56		1,27	0,129	0,054	0,97	0,182	0,107
6,3	1,56		1,15	0,150	0,075	0,85	0,204	0,129
6,8	1,56		1,20	0,141	0,066	1,02	0,173	0,098
7,3	1,58		1,42	0,102	0,027	1,31	0,122	0,047
7,8	1,60		1,55	0,079	0,004	1,51	0,086	0,011
Mittel	1,57	0,075						

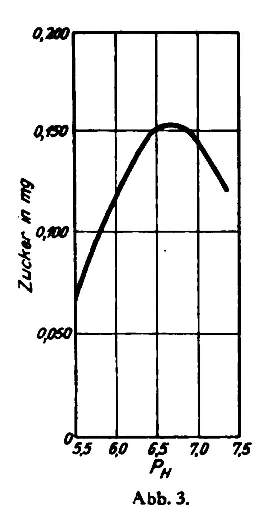


Abb. 3.

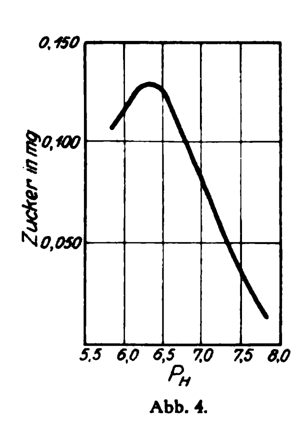


Abb. 4.

Die Resultate dieser Versuche sind in Abb. 3 und 4 graphisch dargestellt. In Übereinstimmung mit zahlreichen Bestimmungen für tierische Amylase [*Rona* und *Eweyk*, l. c., *v. Euler*, *Myrbäck* und *Karlsson* (7) u. a.] finden wir auch für die Blutamylase das p_H-Optimum zwischen p_H 6,3 und 6,8. Alle weiteren Versuche wurden demgemäß unter Zusatz von m/15 Phosphatpuffer (2 primär : 1 sekundär) durchgeführt. Bei diesem p_H wurde auch die optimale NaCl-Konzentration bestimmt.

Tabelle III. Einfluß der NaCl-Konzentration.
Blutmenge 20 cmm pro Bestimmung; Phosphatpuffer p_H 6,5.

NaCl, Endkonzentration	Sofort		Nach 1 Stunde			Nach 2 Stunden		
				Zucker			Zucker	
	Thiosulfat	Zucker	Thiosulfat	Gesamtmenge	Differenz	Thiosulfat	Gesamtmenge	Differenz
Proz.		mg		mg	mg		mg	mg
0	1,70		1,48	0,092	0,036	1,24	0,134	0,078
0,01	1,69		1,19	0,143	0,087	0,73	0,226	0,170
0,03	1,69		1,13	0,154	0,098	0,54	0,262	0,206
0,1	1,65		1,02	0,173	0,117	0,37	0,296	0,240
0,3	1,66		1,03	0,172	0,116	0,45	0,280	0,224
1,0	1,68		1,03	0,172	0,116	0,48	0,274	0,218
Mittel	1,68	0,056						

Konzentrationen über 0,1 Proz. rufen keine weitere Beschleunigung der Amylasewirkung hervor, es wurde deswegen diese NaCl-Konzentration als optimale für die Methode gewählt.

III. Methodik der Amylasebestimmung im Blute.

Auf Grund obiger Ergebnisse schlagen wir folgende zwei Modifikationen der Amylasebestimmung vor:

1. *Für experimentelle Arbeiten* (Untersuchung der Kinetik, zeitlicher Verlauf der Reaktion, Enzymvergiftungen usw.) bemißt man den Ansatz so, daß für jede Bestimmung je 1 ccm 0,3proz. Stärkelösung, 1 ccm Enzymlösung (z. B. Blut 1 : 50), 2 ccm m/15 Phosphatpuffer mit NaCl-Zusatz und Wasser oder etwaige Reagenzien bis zu einem Gesamtvolumen von 5 ccm gelangen.

2. *Für klinische Zwecke:* Erforderliche Lösungen: 1. Täglich frisch bereitete 0,3proz. Stärkelösung. 2. m/15 KH_2PO_4-Lösung mit NaCl-Zusatz, enthaltend 9,078 KH_2PO_4 und 4,5 NaCl im Liter. 3. m/15 Na_2HPO_4-Lösung, enthaltend 11,876 $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ im Liter. (Anstatt der Lösungen 2 und 3 kann man auch eine m/10 KH_2PO_4-Lösung, enthaltend 13,616 KH_2PO_4 und 4,0 NaCl im Liter und eine gewöhnliche n/10 NaOH-Lösung gebrauchen.) 4. Alle Lösungen, die zur Zuckerbestimmung nach *Hagedorn-Jensen* erforderlich sind.

Die Phosphatlösungen werden am besten gesondert aufbewahrt und zum Gebrauch im Verhältnis 1 Teil Natriumphosphat zu 2 Teilen Kaliumphosphat vermischt. Will man nach *Clark* mit KH_2PO_4 und Lauge arbeiten, so setzt man zu je 50,0 ccm der oben angegebenen m/10 KH_2PO_4-Lösung 16,6 ccm n/10 NaOH hinzu.

Aus der Fingerkuppe werden mittels einer Mikropipette (0,1 ccm in 0,001 geteilt) 0,06 ccm Blut entnommen und in eine Probierröhre mit 3 ccm destillierten Wassers übertragen, die Pipette wird mit dem Wasser durchspült. Nach erfolgter Hämolyse (etwa 10 Minuten) werden

in das Probierröhrchen 3 ccm Puffergemisch gegeben, gut vermischt und aus dem Gemisch je 2 ccm in zwei weitere Probierröhrchen übertragen. Diese dienen zum eigentlichen Versuch (zwei Parallelbestimmungen), während der im ersten Probierröhrchen zurückgebliebene Rest als Kontrolle dient. Die zwei letzten Probiergläser werden mit je 1,0 ccm 0,3 proz. Stärkelösung versetzt, durchgemischt, ein Tropfen Toluol hinzugefügt, verkorkt und in den Thermostaten bei 37° gestellt. Zu der Kontrollprobe werden 5 ccm 0,45 proz. $ZnSO_4$, 1 ccm n/10 NaOH, dann 1 ccm Stärkelösung zugesetzt und durchgemischt; die Probe wird sofort (um etwaige Stärkespaltung zu vermeiden) in das bereits kochende Wasserbad gestellt. Nach 3 Minuten wird die Probe herausgenommen, abgekühlt und in üblicher Weise nach *Hagedorn-Jensen* der Zuckergehalt bestimmt. Die Versuchsproben werden nach 2 Stunden aus dem Thermostaten herausgenommen, mit $ZnSO_4$ und NaOH versetzt und gleichfalls auf ihren Zuckergehalt untersucht. Die Differenz zwischen dem Zuckergehalt der Versuchsproben und demjenigen der Kontrolle gibt die Menge des von der Amylase gebildeten Zuckers an. Die Parallelversuche sollen bei sorgfältiger Arbeit nicht mehr als um 10 bis 15 Proz. differieren.

Verfügt man nicht über eine Mikropipette oder will man mit noch kleineren Blutmengen auskommen, so kann man auf die Parallelbestimmung verzichten und sich zur Blutentnahme einer 20-cmm-Pipette vom *Sahli*schen Hämometer bedienen. Dann mißt man in zwei Probierröhren je 1 ccm Wasser ab, trägt in jedes die mit der Pipette aufgefangenen 20 cmm Blut ein, läßt hämolysieren, fügt je 1 ccm Puffergemisch hinzu, stellt die eine Probe nach Stärke- und Toluolzusatz in den Thermostaten und verarbeitet die andere als Kontrolle, wie oben beschrieben.

Das Blut kann nach der Entnahme längere Zeit stehen, ohne daß die Amylaseaktivität merklich beeinflußt wird. Wir konnten gelegentlich sogar nach 24 Stunden langem Aufbewahren bei Zimmertemperatur eine nur ganz geringe Abnahme der Enzymaktivität beobachten.

IV. Amylasebestimmung im Speichel und Harn.

Obige Methode ist sehr gut auch für die Amylasebestimmung in Speichel, Harn usw. anzuwenden. Beim Untersuchen des Speichels oder des Harns ist sie besonders bequem, da wegen der starken Verdünnung und des geringen Eiweißgehaltes (abgesehen von Nephritisfällen) die Proteinausfällung und das Filtrieren ganz wegfallen. Es werden die 3 ccm Blutlösung durch 3 ccm Harnlösung (1 : 100) oder Speichelverdünnung (1 : 25000) ersetzt und, wie oben beschrieben, nach Pufferzusatz auf drei Probierröhren zu je 2 ccm verteilt. Zur Zuckerbestimmung führt man den Inhalt der Probierröhren (ohne $ZnSO_4$- und NaOH-Zusatz und ohne Filtrieren) in das Gefäß, in dem

die Reduktion vorgenommen wird, über und spült die Probierröhren zweimal mit je 3 ccm Wasser nach. Es scheint uns nicht ratsam, die Reduktion direkt im Versuchsgefäß vorzunehmen.

Um einen Vergleich des Amylasegehaltes verschiedener Flüssigkeiten zu ermöglichen, schlagen wir vor, die gefundenen Zuckerwerte mit dem Verdünnungsgrad der zu untersuchenden Flüssigkeit zu multiplizieren und in Milligrammen auszudrücken. Erhalten wir z. B. bei einem Versuch mit Blut im Hauptversuch 0,134 mg Zucker, in der Kontrolle 0,056 mg, so ist der Zuckerwert 0,078 mg. Die Verdünnung ist 50fach, der Amylaseindex (A I) also 0,078 × 50 = 3,90. Für die Harnamylase erhalten wir etwa doppelt so hohe Werte wie für die Blutamylase, für die Speichelamylase sind sie 300- bis 1000mal höher als beim Blute. Es erstrecken sich unsere Erfahrungen bezüglich der Harn- und Speichelamylase vorläufig nur über einzelne Versuche, so daß die angeführten Werte nur zur Orientierung über die Größen*ordnung* dienen sollen.

Bevor wir als Belege einige Versuchsergebnisse anführen, möchten wir ausdrücklich betonen, daß zum guten Gelingen der Versuche große Sauberkeit der Versuchsgeräte unbedingt nötig ist. Ganz besonders muß man darauf achtgeben, daß auch nicht die geringsten Spuren Speichel beim Abmessen der Lösungen in die Pipetten gelangen. Schon 0,02 cmm würden den Versuch vereiteln.

1. Fehlergrenze der Methode. Acht Parallelversuche mit derselben Blutlösung.

Versuchsperson		Zuckergehalt mg								
M. G.	Hauptversuch	1,117	0,117	0,127	0,113	0,119	0,115	0,124	0,134	Mittel 0,062
	Kontrolle . .	0,059								
	Differenz . .	0,058	0,058	0,068	0,054	0,060	0,056	0,065	0,075	
	Abweichung v. Mittelwert . .	−0,004	−0,004	+0,004	−0,008	−0,002	−0,006	+0,003	+0,013	
M. G.	Hauptversuch	0,122	0,117	0,117	0,120	0,117	0,117	0,116	0,120	Mittel 0,062
	Kontrolle . .	0,056								
	Differenz . .	0,066	0,061	0,061	0,064	0,061	0,061	0,060	0,064	
	Abweichung v. Mittelwert . .	+0,004	−0,001	−0,001	+0,002	−0,001	−0,001	−0,002	+0,002	
M. M.	Hauptversuch	0,138	0,134	0,146	0,141	0,141	0,145	0,136	0,146	Mittel 0,089
	Kontrolle . .	0,052								
	Differenz . .	0,086	0,082	0,094	0,089	0,089	0,093	0,084	0,094	
	Abweichung v. Mittelwert . .	−0,003	−0,007	+0,005	±0,0	±0,0	+0,004	−0,005	+0,005	
M. G.	Hauptversuch	0,113	0,110	0,111	0,110	0,110	0,111	0,106	0,106	Mittel 0,051
	Kontrolle . .	0,059								
	Differenz . .	0,054	0,051	0,052	0,051	0,051	0,052	0,047	0,047	
	Abweichung v. Mittelwert . .	+0,003	±0,0	+0,001	±0,0	±0,0	+0,001	−0,004	−0,004	

2. Amylasebestimmungen an verschiedenen Personen.

Versuchsperson	Zucker			Amylaseindex
	Kontrolle mg	Hauptversuch mg	Differenz (Mittel) mg	
D. M.	0,048	0,152—0,141	0,098	4,90
W. E.	0,056	0,134—0,124	0,073	3,65
A. K.	0,063	0,108—0,106	0,041	2,05
M. G.	0,063	0,102—0,099	0,037	1,85
E. H.	0,056	0,155	0,099	4,95
A. O.	0,057	0,124—0,120	0,065	3,25
E. S.	0,052	0,172—0,166	0,117	5,85

3. Amylasebestimmung im Harn.

	Zucker			Amylaseindex
	Kontrolle mg	Hauptversuch mg	Differenz mg	
a) Harnverdünnung				
1 : 50	0,104	0,300	0,196	9,80
1 : 100	0,066—0,063	0,159—0,161	0,096	9,60
b) Harnverdünnung 1 : 100				
Ohne Proteinfällung	0,059	0,184—0,200	0,133	6,65
Mit Proteinfällung	0,056	0,200—0,195	0,142	7,10

4. Amylasebestimmung im Speichel. Ohne Proteinfällung. Acht Parallelversuche.

		Zucker in mg								
Speichelverdünnung 1 : 25 000	Hauptversuch	0,127	0,117	0,125	0,117	0,124	0,122	0,127	0,119	Mittel 0,079
	Kontrolle . .	0,043								
	Differenz . .	0,084	0,074	0,082	0,074	0,081	0,079	0,084	0,076	

Amylaseindex: 1975,0

Literatur.

1) *Wohlgemuth*, diese Zeitschr. **9**, 1, 1908. — 2) *Holmbergh*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **134**, 68. — 3) *Rona* und *van Eweyk*, diese Zeitschr. **149**, 174, 1924. — 4) *Paechtner*, ebendaselbst **156**, 249, 1925. — 5) *Fyfe*, Brit. Journ. of exper. Pathol. **4**, 127, 1923. — 6) *Hagedorn* und *Jensen*, diese Zeitschr. **135**, 46, 1923. — 7) *H. v. Euler*, *Myrbäck* und *Karlsson*, Zeitsch. f. physiol. Chem. **148**, 243, 1925.

Eine Multimikroelektrode zu gleichzeitiger p_H-Bestimmung in vielen und verschiedenen Objekten.

Von

B. Solowiew.

(Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut zu Kiew.)

(Eingegangen am 15. Oktober 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Zur Messung der Wasserstoffionenkonzentration auf elektrometrische Weise wurde von vielen Autoren eine große Anzahl von Wasserstoffelektroden der aller verschiedensten Konstruktion vorgeschlagen, wobei jedoch jeder Apparat im besonderen zur p_H-Bestimmung gleichzeitig nur in einem einzigen Objekt dient. Die p_H-Bestimmung mit ein und derselben Wasserstoffelektrode gleichzeitig in einer ganzen Reihe von Objekten wäre sowohl mit Ersparnis von Zeit verbunden, welche zu verschiedenen Handgriffen beim Ersetzen des zu untersuchenden Objektes durch eine neue Probe notwendig ist, als auch mit dem Bedürfnis, die p_H-Bestimmung in vielen Proben unter ein und denselben Versuchsbedingungen auszuführen. Zum genannten Zwecke haben wir das Modell einer Multimikroelektrode konstruiert, welche zu gleichzeitiger p_H-Bestimmung in vielen und verschiedenen Objekten dienen kann, wobei jede zu untersuchende Probe von sehr geringer Menge sein kann (z. B. ein Tropfen).

Die Konstruktion dieser Elektrode, welche mit der von *Lehmann*[1]) zur p_H Bestimmung in einer geringen Menge von Flüssigkeit vorgeschlagenen in Zusammenhang steht, ist in der Hauptsache folgende (s. Abb. 1 und 2).

Ein hohler Glaszylinder *A* und die Basis *B* stellen die zwei Hauptteile der vorliegenden Elektrode dar. Der Zylinder *A* hat (in der Elek-

---

[1]) *G. Lehmann*, diese Zeitschr. **139**, 213, 1923.

trode auf Abb. 1 und 2) einen lichten Durchmesser von 7 cm und eine innere Höhe von 3 cm. Die obere Öffnung des Zylinders ist mit einem

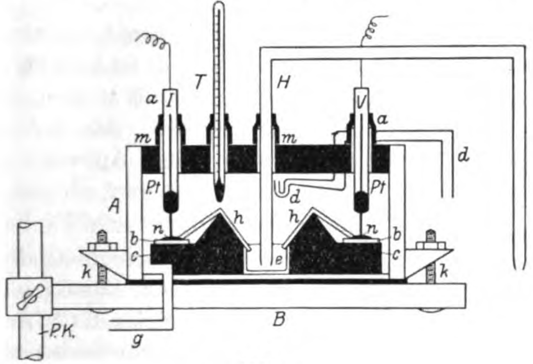


Abb. 1.

paraffinierten Holzstopfen dicht verschlossen, in dem sich eine Reihe von Durchbohrungen zur Einführung der Platinelektroden *Pt*, eines Glasröhrchens, welches einem KCl-Agarheber *H* als Führung dient, eines Thermometers *T* und eines Glasröhrchens zur Gaszufuhr *d* befinden, wobei durch dieses letztere das Gas von unten nach oben einströmt. In diese Öffnungen sind kurze Glasröhrchen mit Gummimuffen *m* eingelassen, welche rasche Manipulationen mit der Platinelektrode gestatten und gleichzeitig vollständig hermetischen Verschluß des Apparates garantieren. Die beschriebenen Stellen für die Platinelektroden sind numeriert, und auf diese Weise ergibt sich bei der Aufstellung des Glaszylinders *A* auf die Basis *B* stets das Zusammentreffen der Platinelektroden mit den unten beschriebenen Glastischchen *b* für die zu untersuchenden Proben. Die Basis *B* stellt einen paraffinierten Holzstopfen (besser aus Ebonit) dar, welcher der unteren Öffnung des Glaszylinders angepaßt und fest in den Support eingeschmolzen ist, dieser letztere gibt die Möglichkeit, den Apparat auf jedem beliebigen Stativ zu befestigen. Dieser Stopfen drückt sich vermittelst dreier Bolzen *k* eng an den Glaszylinder an. An dem Stopfen, der bei unserem Modell einen Durchmesser von 8 cm hat, ist ein Paraffinzylinder *c* von 6,5 cm Durchmesser und 1 cm Höhe fest angebracht. In das Zentrum des Paraffinzylinders ist ein Glasschälchen *e* zur Anfüllung mit gesättigter KCl-Lösung eingelassen, und an der Peripherie sind Glasplättchen (Tischchen) *b* von 1,2 × 1,2 cm Größe eingeschmolzen. Das Paraffin (höherer Schmelzpunkt) wurde gewählt als eines der besten Dielektrika. Zwischen dem Schälchen *e* und den peripherischen Plättchen *b*, die zur Aufnahme des zu untersuchenden Objektes *n* dienen, befindet sich eine kleine Paraffinwelle von 0,5 cm Höhe. Durch den beschriebenen Stopfen wird eine gebogene Glasröhre *g* eingeführt,

die zur Gasableitung dient, und zwar so, daß das Gas durch das Rohr seitlich von dem Paraffinzylinder ausströmt. Zwischen dem unteren abgeschliffenen Teile des Glaszylinders und dem beschriebenen Stopfen *B* befindet sich eine Gummizwischenlage, die zum hermetischen Verschluß des Apparats dient. Die Größe der Elektrode ist beliebig. Im speziellen gehören die oben beschriebenen Größenmaße des auf Abb. 1 und 2 dargestellten Apparats zu einer Elektrode, die zu gleichzeitiger p_H-Bestimmung in acht Proben geeignet ist.

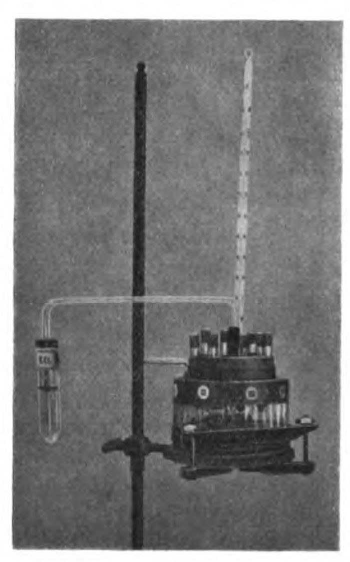


Abb. 2.

Die Beschickung des Apparats ist recht einfach. Das Glasschälchen *e* wird mit gesättigter KCl-Lösung angefüllt. Die zu untersuchenden Proben *n* werden auf die Glastischchen *b* gebracht. Die dünnen Glasröhrchen *h*, die rechtwinklig gebogen und mit KCl-Agar angefüllt sind (KCl-Agarheber), werden bis zur Ausführung des Versuchs in gesättigter KCl-Lösung aufbewahrt, abgetrocknet und in der Weise der Welle aufgesetzt, daß das eine Ende die zu untersuchende Probe *n* berührt und das andere die Flüssigkeit in dem Schälchen *e*. Dann setzt man den Glaszylinder *A* auf die Basis *B*, befestigt ihn mit den Bolzen *k*, führt in die entsprechenden Stellen die Platinelektroden *Pt* ein, dann den KCl-Agarheber *H* zur Verbindung der Flüssigkeit in dem Schälchen *e* mit der analogen Flüssigkeit in dem Gefäß, in welches das Ende der Kalomelelektrode eingetaucht ist. Hierauf führt man das Thermometer *T* ein und verbindet schließlich das Röhrchen *d* mit der Gasquelle, das Röhrchen *g* aber mit dem Wasserverschluß, der die Passiergeschwindigkeit des Gases genau regulieren läßt. Die Platinelektroden[1]) *Pt* werden in die Kette mit Hilfe von Leitungsdrähten, die mit Silberdrahtenden versehen sind, eingeschaltet; diese werden

[1]) Die gebräuchlichen Platinelektroden stellen Glasröhrchen dar, die an einem Ende verlötet sind, wobei der eingeführte Platindraht über das verlötete Ende des Röhrchens um 1 cm hinausragt, und das innere Ende des Drahtes ist amalgamiert. Das Röhrchen wird bis zu 1 cm Höhe mit Quecksilber angefüllt, welches noch mit einer dünnen Schicht von Petroleum bedeckt wird, um die Bildung von Belag an der Oberfläche des Quecksilbers zu verhüten.

in das Quecksilber getaucht, welches die Röhrchen *a* anfüllt. Mit Hilfe des Umschalters wird eine hintereinanderfolgende Schaltung jeder einzelnen Platinelektrode *Pt* erzielt. Alle vom Umschalter ausgehenden Leitungsdrähte sind numeriert und gut voneinander isoliert. Die innerhalb der Elektrode sich befindende Schale *e* mit KCl-Lösung schließt die Möglichkeit des Austrocknens des Objektes aus. Die vorliegende Elektrode dient, wie aus der Beschreibung ersichtlich, zur p_H-Bestimmung bei konstantem Gasstrom. Bei Messung von CO_2-haltigen Objekten muß man eine Mischung von Wasserstoff mit CO_2 unter bestimmtem Partialdruck durchlassen[1]). Zur Feststellung eines konstanten Potentials ist gewöhnlich ebensoviel Zeit erforderlich, wie es *Lehmann* (l. c.) auch für seine Mikroelektrode zeigt. Eine ganze Reihe mannigfaltiger p_H-Bestimmungen durch die geschilderte Elektrode zeigte, daß die erhaltenen Resultate im allgemeinen den Angaben analog sind, die bei Messungen mit anderen Elektroden [*L. Michaelis*[2]), *Lehmann*] gewonnen wurden und die gewöhnlichen Schwankungen aufweisen, die auch den anderen (erwähnten) Elektroden eigen sind.

Mit der beschriebenen Elektrode kann man p_H sowohl in flüssigen, als auch in festen Objekten (koaguliertes Plasma und dergleichen) bestimmen. Insonderheit halten wir es für möglich, mit der vorliegenden Elektrode p_H gleichzeitig in vielen Gewebskulturen zu bestimmen, die zur Explantation auf die Deckgläser gebracht sind, ohne ihre Intaktheit zu verletzen.

Die vorliegende Elektrode kann auch zur Arbeit mit biologischen Objekten dienen. In von Prof. *P. Kutscherenko* und mir[3]) angestellten Versuchen wurden mit der genannten Elektrode p_H-Werte gleichzeitig im Blute und in vielen Extrakten verschiedener Organe ein und desselben Tieres bestimmt, was nicht nur eine Ersparnis an Zeit, Tiermaterial und dergleichen ergab, sondern auch die Möglichkeit bot, die aktuelle Reaktion des Organismus bei ein und denselben Versuchsbedingungen zu studieren.

---

[1]) *R. Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig 1924.

[2]) *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1922.

[3]) *P. Kutscherenko* und *B. Solowiew*, Arbeiten des II. Allrussischen Pathologenkongresses. Moskau 1925.

Eine Mikromethode zur quantitativen Bestimmung von Milchsäure und milchsauren Salzen in reinen Lösungen

Von

Klaus Hansen.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Oslo.)

(Eingegangen am 16. Oktober 1925.)

Methoden zur quantitativen Milchsäurebestimmung liegen in großer Zahl vor; sie erfordern zum Teil größere Milchsäuremengen, zum Teil sind sie wenig genau. Die Bestimmung stößt nämlich auf Schwierigkeiten verschiedener Art.

So führt eine direkte Titrierung mit Natronlauge nicht zum Ziel; wegen der großen Neigung der Milchsäure zur Anhydridbildung wird sie immer zu niedrige Resultate ergeben (13). Milchsäurelösungen müssen daher vor der Titrierung mit Alkali gekocht werden (12). Dabei ist diese Methode auch unanwendbar bei der Bestimmung von Lactaten. Die Konzentration vermittelst des optischen Drehungsvermögens zu bestimmen, ist ebenfalls nicht angängig, weil die Kondensationsprodukte der Milchsäure entgegengesetzt und viel stärker drehen als die Säure selbst (11).

Verschiedene gravimetrische Methoden, die auf Ausfällung der Milchsäure in Form von Zinksalz oder einem anderen Lactat beruhen, sind umständlich; ebenso die von *Ulzer* und *Seidel* (12) nach dem Prinzip der *Benedikt-Zsigmondy*schen Glycerinmethode (2) eingeführte Oxydation mit Kaliumpermanganat in stark alkalischer Lösung zu Oxalsäure nach der Formel

$$CH_3CHOHCOOH + 5O = \begin{matrix} COOH \\ | \\ COOH \end{matrix} + CO_2 + 2H_2O$$

mit nachfolgender Fällung und gravimetrischer Bestimmung der gebildeten Oxalsäure.

Ryffels Methode (11) ist wie die übrigen kolorimetrischen Methoden sehr unsicher.

Die in der biologischen Forschung am meisten angewandten Methoden bestehen in einer Abspaltung von Acetaldehyd aus der Milchsäure und Bestimmung desselben nach Überdestillierung. Die Bestimmung geschieht auf zwei Arten: *Entweder* wird dem Aldehyd Jod in alkalischer Lösung zugesetzt, und die Jodmenge, die nicht zur Jodoformbildung verbraucht wird, wird zurücktitriert (6, 8) [wie *v. Fürth* nachgewiesen hat (4, 5),

liefert dieses Verfahren Fehler bis zu 50 Proz.], *oder* die Bestimmung geschieht durch Natriumbisulfit (3, 10), was bessere Resultate ergibt.

Alle Aldehydmethoden leiden indessen an einem prinzipiellen Fehler: sie setzen voraus, daß die Reaktion der Milchsäure mit dem Oxydationsmittel im Aldehydstadium, also auf einer äußerst labilen Stufe Halt macht. Praktisch wird es nicht zu vermeiden sein, daß ein Teil des sehr leicht oxydablen Aldehyds weiter mit dem Oxydationsmittel reagiert. Die Aldehydmethoden geben daher immer zu niedrige Resultate.

In der vorliegenden Arbeit soll eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Milchsäure und Lactaten in Mengen bis zu einigen Zehnteln Milligramm herab beschrieben werden. Die Methode hat zur Voraussetzung, daß die Milchsäure in einer Lösung vorliegt, die keine anderen reduzierenden Stoffe enthält. Sie beruht darauf, daß Kaliumbichromat-Schwefelsäure in bestimmten Konzentrationsverhältnissen Milchsäure quantitativ zu Essigsäure und Kohlensäure oxydiert nach der Formel:

$$3\,CH_3CHOHCOOH + 2\,K_2Cr_2O_7 = 2\,K_2O + 2\,Cr_2O_3 + 3\,CO_2 \\ + 3\,CH_3COOH + 3\,H_2O.$$

Auf dieser Stufe bleibt die Oxydation stehen; die Essigsäure ist bekanntlich die einzige Fettsäure, die, praktisch gesprochen, von Bichromat-Schwefelsäure nicht angegriffen wird.

Wie die Milchsäure selber, so verhalten sich auch die Lactate. Zur Ausarbeitung der Methode ist eine Lösung von viermal umkristallisiertem Zinklactat benutzt worden, die sich bei Verbrennung und Bestimmung des ZnO-Gehalts praktisch als vollkommen rein erwies.

Die erwähnte Reaktion geht schon bei Zimmertemperatur vor sich. In Tabelle I ist das Ergebnis einer Versuchsreihe wiedergegeben, bei der die Lactatlösung mit Bichromat-Schwefelsäure bei 18° C eine steigende Zahl von Stunden stehengelassen wurde unter Verhältnissen, wie sie den unten bei der Analyse beschriebenen entsprechen.

Tabelle I.

Versuch über die Oxydation der Milchsäure beim Stehen mit Bichromatschwefelsäure bei 18° C.

Dauer des Versuches	Oxydierte Milchsäuremenge in Proz. des zugesetzten Quantums
1 Stunde	79,5
2 Stunden	90,2
5 „	98,0
10 „	99,4

Schon nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur sind, wie man sieht, etwa 80 Proz. der Milchsäure oxydiert. Bei höherer Temperatur verläuft die Reaktion wesentlich rascher. Auch hohe

Säure- und Bichromatkonzentration sowie langdauernde Erwärmung trägt zur Vervollständigung bzw. Beschleunigung der Oxydation bei.

Darauf gerichtete Untersuchungen ergaben jedoch, daß es nicht zweckmäßig ist, eine Schwefelsäure von über 40 Proz. zu benutzen. Schwefelsäure bewirkt nämlich an sich eine Reduktion des Kaliumbichromats. Dies liegt nicht nur an organischen Verunreinigungen, die möglicherweise selbst in „chemisch reiner" Säure enthalten sein können; denn in diesem Falle müßte man die erwähnte Reduktion durch Kochen des Bichromat-Schwefelsäuregemisches vor dem Gebrauch ausschalten können, was indessen nichts hilft. Die Hauptursache liegt in einer direkt reduzierenden Wirkung der Schwefelsäure selber. Bekanntlich besteht eine der Methoden der Sauerstoffherstellung eben darin, daß man konzentrierte Schwefelsäure mit Kaliumbichromat erhitzt. Und diese Spaltung des Bichromatmoleküls macht sich schon bei verhältnismäßig niedrigen Säurekonzentrationen merklich geltend. Sie ist ferner stark von der Temperatur abhängig. Setzt man einer wässerigen Bichromatlösung konzentrierte Schwefelsäure zu, so wird die Erwärmung nicht immer in gleichmäßiger Weise eintreten; im einen Falle wird mehr Bichromat reduziert werden als im anderen, und die Möglichkeit, durch Blindproben die spontane Bichromatreduktion mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen, fällt weg. Verdünnt man dagegen die Säure von vornherein auf 40 Proz., so wird die Wärmeentwicklung unbedeutend; die Autoreduktion ist jetzt eine Funktion der Temperatur, auf die die Flüssigkeit nachträglich erwärmt wird, und damit eine konstante Größe. Die Rücksicht auf die Autoreduktion macht es also zweckmäßig, keine Säure von über 40 Proz. zuzusetzen, wenn auch der Prozeß im Reaktionsgemisch, wo die Säurekonzentration noch niedriger (etwa 25 Proz.) wird, dadurch langsamer verläuft.

Andere Rücksichten machten es notwendig, auch die Temperatur auf Kosten der Reaktionsgeschwindigkeit zu senken. Um die Ausführung der Analyse möglichst einfach zu gestalten und Serienanalysen zu erleichtern, war es nämlich wünschenswert, die Reaktion in einem gut verkorkten Erlenmeyerkolben ohne Rücklaufkühler vor sich gehen zu lassen. Ein verkorkter 100-ccm-Erlenmeyerkolben von Jenaglas, der etwas Wasser oder, was praktisch gesprochen dasselbe ist, 25 proz Schwefelsäure enthält, springt bei Erwärmung auf ungefähr 90° C. Pyrexkolben sind widerstandsfähiger, aber gewöhnlich fliegt bei dieser Temperatur der Pfropfen ab. Aber bei etwa 80° C oder darunter riskiert man weder, daß der Kolben entzwei geht, noch daß der Pfropfen abspringt. Da man indessen damit rechnen muß, daß die Temperatur in einem Wasserbade und zum Teil auch in einem gewöhnlichen Thermostaten Schwankungen von einem gewissen Umfang unterworfen ist,

so ist es am besten, vorsichtig zu sein. Wir sind daher bei der Erwärmung des Reaktionsgemisches auf 70° C stehengeblieben. In vielen hundert Analysen ist es nicht ein einziges Mal vorgekommen, daß der Kolben in Stücke gegangen oder der Kork bei dieser Temperatur abgesprungen wäre. Um die niedrige Säurekonzentration und Temperatur auszugleichen, muß man die Erwärmungszeit entsprechend länger wählen. Tabelle II über Analysen einer Zinklactatlösung, ausgeführt unter Verhältnissen, wie sie den unten bei Beschreibung der Methode angegebenen entsprechen, zeigt die Abnahme der Oxydation mit der Erwärmungszeit. Für jeden Zeitraum ist der Durchschnitt von fünf Einzelanalysen angegeben.

Tabelle II.

Versuche über die Änderung der Milchsäureoxydation mit der Erwärmungszeit.

Erwärmungszeit Min.	Oxydierte Milchsäuremenge in Proz. des zugesetzten Quantums
45	100
40	98,6
35	98,0
30	95,5

Die Grenze für eine vollständige Oxydation unter den vorliegenden Bedingungen liegt also bei einer Erwärmungszeit von 45 Minuten (kleine Milchsäuremengen von weniger als 1 mg werden schon in einer halben Stunde vollständig oxydiert).

Notwendig für eine vollständige Oxydation ist ferner sowohl eine bestimmte absolute Bichromatkonzentration in der Reaktionsflüssigkeit, als ein relativer Bichromatüberschuß über die Menge, die zur Oxydation der Milchsäure verbraucht wird. Die absolute Bichromatkonzentration darf nicht unter etwa 1,5 Prom. liegen. Ein Versuch, die Methode durch Verdünnung der Bichromatlösung für geringere Milchsäuremengen als 0,1 mg anwendbar zu machen, scheiterte an der unvollständigen Oxydation. Bei einer Konzentration in der Reaktionsflüssigkeit von 0,15 Prom. Kaliumbichromat wurden nur 67 Proz. der zugesetzten Milchsäuremenge oxydiert.

Die Abhängigkeit der Oxydation von dem absoluten Bichromatüberschuß geht aus Tabelle III hervor.

Tabelle III.

Versuche über die Änderung der Oxydation mit dem Bichromatüberschuß.

Bichromatüberschuß in Proz. der zur vollständigen Oxydation notwendigen Menge	Oxydierte Milchsäuremenge in Proz. des zugesetzten Quantums
150	100
67	100
25	99,3

Wie man sieht, können bis zu drei Fünftel der Bichromatmenge ausgenutzt werden, ohne daß die Oxydation dadurch minder vollständig wird.

Auch für das Titrieren spielt der Bichromatüberschuß (die absolute Bichromatmenge, die zurücktitriert werden soll) eine Rolle. Die relative Stärke der Thiosulfatlösung nimmt nämlich mit der Bichromatmenge ab. Indessen ist dieses Verhalten erst bei kleineren Bichromatmengen als den bei der vorliegenden Methode in Frage kommenden, von größerer Bedeutung.

Nach der oben gegebenen Orientierung über die Grundlagen der Methode wollen wir im folgenden die Methode selbst beschreiben und zum Schluß ihre Fehlerquellen erforschen und den Umfang ihrer Anwendbarkeit feststellen.

Die Methode.

Reagenzien.

1. Kaliumbichromatlösung, 7,6237 g im Liter enthaltend. 1 ccm dieser Lösung entspricht 3,5 g Milchsäure (oder 4,7311 mg wasserfreien Zinklactats).
2. Natriumthiosulfatlösung, 38,6087 g Natriumthiosulfat mit, oder 24,5872 g ohne Kristallwasser pro Liter enthaltend. Diese Lösung entspricht in Stärke der Bichromatlösung.
3. Chemisch reine Schwefelsäure, 40 Proz. (hergestellt durch Mischen von 6 Teilen konzentrierter Schwefelsäure mit 4 Teilen destillierten Wassers).
4. 10proz. Jodkaliumlösung.
5. Stärkelösung.

Apparatur.

1. Eine Anzahl 100-ccm-Erlenmeyerkolben mit gut schließenden Gummipfropfen.
2. Ein Thermostat oder ein großes Wasserbad mit Thermometer.
3. Ein Satz Titrierapparate mit Mikrobüretten zu 5, besser zu 10 ccm, in $^1/_{100}$ ccm eingeteilt, für die Bichromat- und die Thiosulfatlösung.
4. Eine Mikrobürette mit $^1/_{100}$ ccm Einteilung zur Abmessung der Milchsäurelösung.
5. Zwei gewöhnliche Büretten für Schwefelsäure und destilliertes Wasser, eine 2-ccm-Pipette für die Jodkaliumlösung, eine 1-ccm-Pipette für die Stärkelösung, ein 100-ccm-Meßzylinder für destilliertes Wasser.

Ausführung der Analyse.

In einen 100-ccm-Erlenmeyerkolben werden aus der Mikrobürette 5 ccm Bichromatlösung abgemessen und die Milchsäurelösung, die frei von anderen reduzierenden Stoffen sein muß, zugesetzt. Beträgt die zugesetzte Milchsäurelösung weniger als 5 ccm, so wird destilliertes Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 5 ccm zugefügt. Aus einer Bürette werden 15 ccm 40proz. chemisch reine Schwefelsäure zugesetzt; der Kolben wird mit einem Gummipfropfen gut verschlossen und 1 Stunde in den Thermostaten (oder ins Wasserbad) bei 70° C gesetzt.

Temperaturschwankungen, die $\pm 5^0$ C nicht überschreiten, schaden der Analyse nicht.

Darauf wird mit 50 ccm destillierten Wassers verdünnt; man setzt 2 ccm 10proz. Jodkaliumlösung zu und titriert mit Natriumthiosulfatlösung aus der Mikrobürette mit Stärke als Indikator.

Wie oben erwähnt, reduziert die Schwefelsäure selber etwas Bichromat. Diese Menge beträgt unter den eben beschriebenen Verhältnissen etwa 0,04 ccm Bichromatlösung, aber da sie je nach der Art der angewendeten Schwefelsäure etwas variieren kann, muß sie für jeden einzelnen Fall empirisch bestimmt werden; in eine Reihe von fünf bis zehn Proben soll man eine bis zwei Blindproben einschalten. Die in der Blindprobe reduzierte Bichromatmenge wird von der in der Analyse verbrauchten Menge abgezogen, wodurch man das von der Milchsäure reduzierte Quantum erhält.

Ausrechnung.

Sind ursprünglich zugesetzt b ccm Bichromatlösung und G g Milchsäurelösung, sind für die Zurücktitrierung in der Analyse t ccm Thiosulfatlösung verbraucht worden und beträgt die autoreduzierte Bichromatmenge in der Blindprobe d ccm, so ist die in der Probe enthaltene Milchsäuremenge:

$$g = 3{,}5\,(b - t - d)\ \text{mg}$$

und die Milchsäurekonzentration in der untersuchten Probe:

$$K = \frac{3{,}5\,(b - t - d)}{G}\ \text{Prom.}$$

Fehlergrenzen der Methode. Kritik der Methode.

Die obere Grenze für die Milchsäuremengen, die mit der Methode in der eben beschriebenen Form ohne Modifikationen bestimmt werden können, ist dadurch gegeben, daß nur drei Fünftel der Bichromatmenge, also 3 ccm Bichromatlösung, zur Milchsäureoxydation ausgenutzt werden können. Da 1 ccm Bichromatlösung 3,5 mg Milchsäure oxydiert, wird die Grenze also 10,5 oder rund 10,0 mg. Indessen hindert nichts, die Bichromatmenge auf das Doppelte oder Vielfache zu erhöhen, wenn nur die anderen Flüssigkeitsmengen im gleichen Verhältnis erhöht werden. Eine endliche obere Grenze hat die Methode also nicht. Die untere Grenze ist in der Genauigkeit des Titrierens gegeben; sie liegt bei etwa 0,1 mg.

In Tabelle IV sind als Beleganalysen eine Reihe Bestimmungen von wechselnden bekannten Mengen Zinklactat wiedergegeben. Das Lactat ist in der Kolonne in die entsprechende Menge Milchsäure umgerechnet.

Tabelle IV. **Bestimmungen von wechselnden, bekannten Mengen Zinklactat**

Berechnete Milchsäuremenge mg	Gefundene Milchsäuremenge mg		Berechnete Milchsäurekonzentration Prom.	Gefundene Milchsäurekonzentration Prom.	
20	19,85	19,88	2	1,99	1,99
20	19,95		2	2,00	
20	19,85		2	1,99	
20	19,85		2	1,99	
10	10,15	10,15	2	2,03	2,03
10	10,12		2	2,02	
10	10,15		2	2,03	
10	10,15		2	2,03	
10	10,08		2	2,02	
10	10,19		2	2,04	
10	10,08		2	2,02	
10	10,19		2	2,04	
10	10,15		2	2,03	
10	10,19		2	2,04	
1	0,98	1,00	2	1,96	1,99
1	0,98		2	1,96	
1	1,02		2	2,04	
1	0,98		2	1,96	
1	1,02		2	2,04	
0,4	0,42	0,41	0,2	0,21	0,21
0,4	0,42		0,2	0,21	
0,4	0,42		0,2	0,21	
0,4	0,39		0,2	0,20	

Wie man sieht, nimmt der absolute Fehler mit fallender Milchsäuremenge ab, während der relative Fehler wächst. Bei Milchsäuremengen über 1 mg übersteigt der relative Fehler in keiner Analyse 2 Proz., bei geringeren Mengen (bis zu 0,4 mg herab) nicht 5 Proz. Bei noch geringeren Mengen bedingt der Ablesungsfehler an der Bürette eine größere relative Unsicherheit.

In Tabelle V werden schließlich als Illustration für die praktische Anwendung der Methode eine Reihe Analysen wiedergegeben, ausgeführt mit wechselnden Mengen einer durch Verdünnung einer konzentrierten Säure hergestellten Milchsäurelösung, die bei direkter acidimetrischer Titrierung einen Gehalt von 1,48 Prom. ergab.

Tabelle V. Analysen wechselnder Mengen einer Milchsäurelösung von unbekannter Konzentration.

Zugesetzte Milchsäurelösung ccm	Gefundene Milchsäure mg	Gefundene Milchsäurekonzentration Prom.
5	9,38	1,88
5	9,49	1,90
2,5	4,73	1,89
2,5	4,69	1,89
1,0	1,89	1,89
1,0	1,89	1,89

Die vorliegenden Versuche sind mit racemischer Milchsäure und Zinklactat angestellt, aber es liegt kein Grund zu der Annahme vor, daß die aktiven Milchsäuren ein abweichendes Verhalten zeigen sollten. Eine Einschränkung der Anwendbarkeit der Methode liegt darin, daß die Milchsäure in reiner Lösung vorliegen muß. Bei Verwendung biologischen Materials wird dies einen sorgfältigen und zum Teil schwierigen Reinigungsprozeß erfordern. Ein Vorteil ist es indes, daß nicht alle organischen Stoffe von Bichromat-Schwefelsäure unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen nennenswert angegriffen werden.

Die vorliegende Arbeit ist auf Anregung von Prof. Dr. med. *Sophus Torup* ausgeführt worden, von dem auch der Gedanke stammt, die Oxydation mit Kaliumbichromat zur Bestimmung zu benutzen. Ich spreche ihm hiermit meinen ergebenen Dank aus.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Milchsäure durch Oxydation zu Essigsäure und Kohlensäure nach der Formel:

$$CH_3CHOHCOOH + O_2 = CH_3COOH + CO_2 + H_2O$$

beschrieben. Die Oxydation geschieht durch einstündige Erwärmung der etwa 1,5 Prom. Kaliumbichromat und etwa 25 Proz. Schwefelsäure enthaltenden Flüssigkeit auf 70° C in einem mit Gummipfropfen verschlossenen 100-ccm-Erlenmeyerkolben. Die nicht reduzierte Bichromatmenge wird mit Natriumthiosulfat zurücktitriert. Für Mengen über 1 mg liegt der relative Fehler unter 2 Proz.

Literatur.

1) *F. Beilstein*, Handb. d. organ. Chem. **8**, 261ff. Berlin 1921. — 2) *R. Benedikt* und *R. Zsigmondy*, Chem.-Ztg. **9**, 975, 1885; zit. nach *Vaubel*. — 3) *S. W. Clausen*, Journ. of biol. Chem. **52**, 263, 1922. — 4) *O. von Fürth*, diese Zeitschr. **24**, 266, 1910. — 5) *O. von Fürth* und *D. Charnass*, ebendaselbst **26**, 199, 1910. — 6) *E. Jerusalem*, ebendaselbst **12**, 361, 1908. — 7) *G. Lunge* und *E. Berl*, Chemisch-technische Untersuchungsmethoden **8**, 973ff. Berlin 1910. — 8) *J. Mondschein*, diese Zeitschr. **42**, 91, 1912. — 9) *H. Pringsheim*, Nachweis und Bestimmung der biologisch wichtigen Säuren. Milchsäure, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. **2**, 28, 1910. — 10) *M. Ripper*, Monatsh. f. Chem. **21**, 1079, 1900; zit. nach Chem. Centralbl. **1**, 477, 1901. — 11) *J. H. Ryffel*, Journ. of Physiol. **39**, V, 1909/10. — 12) *F. Ulzer* und *H. Seidel*, Monatsh. f. Chem. **18**, 138, 1897; zit. nach *Vaubel* **2**, 82. — 13) *V. Vaubel*, Die physikalischen und chemischen Methoden der quantitativen Bestimmung organischer Verbindungen **2**, 82 und 410. Berlin 1902. — 14) *J. Wislicenus*, Liebigs Ann. **167**, 302, 1873.

Eine einfache Vorrichtung zum Füllen von Mikrobüretten.

Von

F. v. Krüger.

(Aus der physiologisch-chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 16. Oktober 1925.)

Das Füllen einfacher Mikrobüretten durch Eingießen der Flüssigkeit in dieselben ist wegen der Enge ihrer Lumina zum mindesten äußerst mühsam und schwierig, wenn nicht gar unmöglich. Man ist daher, wenn man nicht zu komplizierten Büretten mit besonderen Vorrichtungen, wie solche nach *Pincussen*, seine Zuflucht nehmen will, auf das Ansaugen der Flüssigkeit angewiesen. Aber auch dieses hat seine Unbequemlichkeiten. Will man mit dem Munde ansaugen, so kann man freilich das zufällige Einfließen von Speichel durch Anlegen eines Gummischlauches an das obere Bürettenende vermeiden. Es läßt sich jedoch das Aufsteigen der Flüssigkeit nur schwer genau kontrollieren, und der an der Bürette baumelnde Schlauch wirkt auch nicht selten störend.

Das Ansaugen mittels einer Wasserstrahlpumpe, welches häufig geübt wird, birgt ebenfalls Nachteile in sich, denn zum Füllen muß jedesmal der verbindende Schlauch an die Bürette angebracht und nach beendeter Füllung wieder von ihr abgenommen werden, was nicht nur lästig, sondern auch zeitraubend ist.

Ich benutze daher in letzter Zeit Mikrobüretten, welche ich mit einer gleich zu beschreibenden Vorrichtung versehen habe und die mir ausgezeichnete Dienste leisteten. Ich kann sie daher aufs beste empfehlen.

Die Vorrichtung besteht in folgendem.

Auf die Bürette ist ein kleiner Gummiballon aufgesetzt. Unterhalb desselben und etwa 5 cm oberhalb des Teilstriches 0 ist in die Bürettenwand ein kleines Loch von ungefähr 3 bis 4 mm Durchmesser geblasen, welches als Ventil dient.

Soll die Bürette gefüllt werden, so wird das Ende des Ausflußrohres derselben bei geöffnetem Hahn in die in einem kleinen Bechergläschen sich befindende Flüssigkeit getaucht, alsdann der Gummiballon mit der rechten Hand zusammengedrückt, darauf die Ventilöffnung mit einem Finger der linken Hand geschlossen und der Ballon wieder freigegeben. Die Flüssigkeit beginnt sofort, in die Bürette zu steigen. Sobald sie den Teilstrich 0 erreicht hat, schließt man den Hahn und entfernt den Finger von der Ventilöffnung. Die Bürette ist nun gebrauchsfertig gefüllt.

Die Vorteile, welche die beschriebene Vorrichtung bietet, liegen auf der Hand und sind im wesentlichen folgende:

1. Die Füllung der Bürette geht sehr leicht und exakt vonstatten.

2. Das Aufsteigen der Flüssigkeit läßt sich mühelos und genau verfolgen und nach Wunsch bei jedem beliebigen Teilstrich unterbrechen.

3. Das Reinigen und Trocknen bietet viel weniger Schwierigkeiten, als bei den Mikrobüretten mit einem durch einen Hahn mit der eigentlichen Bürette verbundenen Zuflußrohr für die einzufüllende Flüssigkeit, wie z. B. denen nach *Pincussen*. Es ist nur nötig, nach beendeter Bestimmung den Rest der in der Bürette verbliebenen Flüssigkeit durch Druck auf den Ballon bei geöffnetem Hahn zu entfernen, durch wiederholtes Ansaugen und Ausblasen destillierten Wassers die Bürette gründlich durchzuspülen und endlich, wiederum mit Hilfe des Ballons und des Ventils, so lange Luft durch sie zu treiben, bis sie vollkommen trocken ist.

Die Bürette wird von der Firma *C. Desaga* G. m. b. H. in Heidelberg hergestellt und kann jederzeit von ihr bezogen werden.

Über die Beteiligung des Chitins am Aufbau der Pilzzellwand.

Von

N. J. Proskuriakow.

(Aus dem Timiriaseff-Forschungsinstitut in Moskau.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1925.)

Schon im Jahre 1811 zeigte *Braconnot*[1]) das Vorkommen von Fungin in Pilzen an, welches nach Behandeln der Pilzsubstanz mit schwachen Alkalien und heißem Wasser ungelöst zurückblieb.

Erst nachher wurde der Unterschied zwischen Fungin und Cellulose von *Fremy*[2]) und *Boudier*[3]) sichergestellt. *De Bary*[4]) bezeichnete das Fungin als eine Sonderart der Cellulose, mit dem Namen Pilzcellulose. 1823 wurde von *Odier*[5]) ein neuer Körper, das Chitin, aus Krebs- und Insektenpanzern dargestellt. Nur im Jahre 1894 wurde aber das Chitin auch in Zellwänden der Pilze von *E. Winterstein*[6]) und *Gilson*[7]) gesucht und seine Beteiligung am Aufbau derselben wahrscheinlich gemacht. Nach *E. Winterstein* enthielt die von ihm dargestellte Pilzcellulose noch 0,7 bis 5,5 Proz. Stickstoff und stellte einen Körper vor, der neben einem glucosegebenden auch einen glucosamingebenden Komplex enthielt und von der eigentlichen Cellulose ganz verschieden war. Die Befunde *Gilsons* führten im allgemeinen zu den gleichen Vorstellungen über die Pilzcellulose, wobei es *Gilson* noch gelang, einen dem tierischen Chitosan entsprechenden Körper, das Mycosin, zu erhalten. Die folgenden Untersuchungen von *Tanret*[8]) und *Iwanow*[9]), sowie die mikrochemischen Arbeiten von *van Wisselingh*[10]) trugen noch mehr dazu bei, um die Beteiligung des Chitins

---

[1]) Ann. de chim. 79, 256, 1811; 80, 372, 1812.

[2]) C. r. 48, 1859.

[3]) Die Pilze 1867.

[4]) Morphologie und Physiol. d. Pilze 1866, 1884.

[5]) *Odier*, zitiert nach *H. Pringsheim*, Die Polysaccharide 1923.

[6]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 1894; 21, 1895/96; Ber. d. deutsch. chem. Ges. 27, 3113, 1894; 28, 167, 774, 1372, 1895.

[7]) Bull. soc. chim. (3) 11, 1099, 1894; C. r. 120, 1000, 1894; Ber. d. deutsch. chem. Ges. 28, 821, 1895.

[8]) Bull soc. chim. 17, 921; Chem. Centralbl. 1898, I, S. 71.

[9]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 524; Chem. Centralbl. 1902, I, S. 531.

[10]) Jahrb. d. wiss. Bot. 31, 616, 1898; *Vouk*, Ber. d. bot. Ges. 33, 413, 1915.

im Bau der Zellwand der Pilze wahrscheinlich zu machen. Jedoch gelang es erst *Scholl*[1]) im Jahre 1908, den dem tierischen Chitin entsprechenden Körper aus Boletus edulis direkt in reinem Zustande zu erhalten, wobei die Chitinmenge 5 bis 6 Proz. der Pilztrockensubstanz entsprach. Vor wenigen Jahren wurde endlich ein neues mikrochemisches Verfahren zum Nachweis von Chitin nicht mehr in Form einer Farbenreaktion, sondern in Form der Darstellung eines charakteristischen kristallinischen Chitosansalzes von *Brunswik*[2]) angegeben.

Da die Anwesenheit, Rolle und Bedeutung des Chitins in der Pilzwand ein großes Interesse bietet, unternahm ich auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. *A. Kiesel* eine Untersuchung, in der die Methode der Chitinabscheidung nach *Scholl* für einige noch nicht derart untersuchte Pilze und zugleich auch die Methode von *Brunswik* der Darstellung des Chitosansulfats für diese Pilze angewendet wurde.

Zur Untersuchung wurden die an der Luft getrockneten und dann zerkleinerten Fruchtkörper von Agaricus campestris, Lactarius volemus, Armillaria mellea und Polyporus betulinus je zu 100 bis 125 g in lufttrockenem Zustande genommen. Die Verarbeitung geschah mit nur geringen Abänderungen nach den Angaben von *Scholl*. Das Material wurde zuerst mit der 20fachen Menge von Wasser 4 bis 5 mal 1 bis 2 Stunden lang ausgekocht, wobei der Rückstand bald abgepreßt, bald abgesaugt wurde. Nachdem das Waschwasser fast farblos abzufließen begann, wurde der Rückstand abwechselnd (6 bis 7 mal) mit der zehnfachen Menge 10proz. Natronlauge und mit Wasser 1 bis 2 Stunden lang gekocht, bis das Filtrat wieder ganz farblos wurde und keine Trübung beim Ansäuern zu bemerken war. Zuletzt wurde der gelblich graue aufgeschwollene Rückstand, in dem noch deutlich das Pseudoparenchym zu erkennen war, mehrfach mit Wasser ausgewaschen. Die noch feuchte Substanz färbte sich gelb und gelbbraun mit Chlorzinkjod, Jodjodkalium und Jod und Schwefelsäure und war in Kupferoxydammoniaklösung und starker Kalilauge, in letzterer auch beim Erwärmen, vollständig unlöslich. Die Substanz wurde dann mit 1proz. Kaliumpermanganatlösung zum dicken Brei angerührt und bis zur Entfärbung der Lösung stehengelassen. Das dunkelbraune Gemisch der Substanz mit Mangansuperoxyd wurde abgesaugt und mit verdünnter Salzsäure (1 : 40) bei Zusatz von 0,5 bis 1 g Oxalsäure schwach erwärmt. Die fast schneeweiß gewordene Masse wurde unter Dekantieren mit Wasser salzsäurefrei gewaschen, mit 96proz. Alkohol ausgekocht, mit absolutem Alkohol und Äther entwässert, im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

---

[1]) Monatsschr. f. Chem. **29**, 1023, 1908; *Zellner*, ebendaselbst **32**, 1911.
[2]) Diese Zeitschr. **113**, 111, 1921.

Die freilich nicht ganz quantitativ während der Verarbeitung gesammelten Rückstände entsprachen in Prozenten der Ausgangssubstanz

für Agaricus campestris . . . . . . 5,5 Proz.
„ Lactarius volemus . . . . 3,0 „
„ Armillaria mellea . . . . 2,8 „
„ Polyporus betulinus . . . 3 bis 5 „

Die aus den drei zuerst genannten Pilzen dargestellten Präparate bildeten nach Zerreiben ein gelblich graues Pulver und wiesen die gleichen Eigenschaften und die gleiche Zusammensetzung auf. Dasjenige aus Polyporus betulinus bildete ein fast weißes lockeres Pulver, welches ganz andere Eigenschaften besaß und deshalb getrennt beschrieben werden soll.

1. Chitin aus Hutpilzen.

Die Präparate aus den drei untersuchten Hutpilzen waren in Wasser, organischen Lösungsmitteln, schwacher und starker, selbst kochender Lauge und Kupferoxydammoniaklösung unlöslich, lösten sich jedoch allmählich in Salzsäure von 1,16 und Schwefelsäure von 1,70. Die Analyse der Präparate ergab folgende Zahlen:

	C	H	Asche	Auf aschefreie Substanz berechnet		
	Proz.	Proz.	Proz.	C Proz.	H Proz.	N Proz.
Agaricus campestris	46,46	6,75	0,91	46,89	6,81	6,15
Lactarius volemus	46,73	6,42	0,28	46,86	6,45	6,31
Armillaria mellea	46,19	6,49	2,48	47,36	6,65	6,20
Boletus edulis *(Scholl)*	46,29	6,41	2,54	—	—	6,03**)
Tierisches Chitin *(Fürth)* . . .	46,37	6,48	—*)	—	—	6,42**)

*) Nicht angegeben. — **) In aschehaltigen Präparaten.

Agaricus campestris.

0,0976 g aschehaltiger Substanz gaben 0,1662 g CO_2 oder 46,44 Proz. C und 0,0596 g H_2O oder 6,83 Proz. H.

0,0981 g aschehaltiger Substanz gaben 0,1672 g CO_2 oder 46,48 Proz. C und 0,0584 g H_2O oder 6,66 Proz. H.

0,2612 g aschefreier Substanz enthielten 0,0162 g oder 6,19 Proz. N.
0,2537 g „ „ „ 0,0155 g „ 6,11 „ N.

Lactarius volemus.

0,1372 g aschehaltiger Substanz gaben 0,2342 g CO_2 oder 46,55 Proz. C und 0,0803 g H_2O oder 6,54 Proz. H.

0,1355 g aschehaltiger Substanz gaben 0,2334 g CO_2 oder 46,98 Proz. C und 0,0788 g H_2O oder 6,51 Proz. H.

0,1230 g aschehaltiger Substanz gaben 0,2104 g CO_2 oder 46,65 Proz. C und 0,0684 g H_2O oder 6,22 Proz. H.

0,1355 g aschefreier Substanz enthielten 0,0086 g oder 6,35 Proz. N.
0,1218 g „ „ „ 0,0076 g „ 6,26 „ N.

Armillaria mellea.

0,1289 g aschehaltiger Substanz gaben 0,2188 g CO_2 oder 46,29 Proz. C und 0,0750 g H_2O oder 6,51 Proz. H.

0,1310 g aschehaltiger Substanz gaben 0,2214 g CO_2 oder 46,09 Proz. C und 0,0757 g H_2O oder 6,46 Proz. H.

0,2587 g aschefreier Substanz enthielten 0,0160 g oder 6,20 Proz. N.

Mit Jodlösung erhielten die Präparate eine bräunliche Farbe, die durch Schwefelsäure einen rötlichen, sogar violetten Ton annahm; durch Chlorzinkjod wurde violette Färbung erzeugt.

Den Eigenschaften und der Zusammensetzung nach mußten die Rückstände der nach der Methode von *Scholl* behandelten Pilzmasse reines Chitin vorstellen, wogegen *E. Winterstein* und *Gilson* nach ihrer Methode ein Gemisch von Chitin mit einem stickstofffreien Kohlenhydrat erhielten, ebenso wie es auch noch bei der Behandlung nach *Scholl* für Polyporus betulinus von mir erhalten wurde (s. unten).

Jedes Präparat wurde nach *Hoppe-Seyler*[1]) mit Kalilauge zur Darstellung von Chitosan verschmolzen, wonach die Schmelze in Wasser oder auch zur Beschleunigung in Alkohol gelöst und das Ganze in ein hohes, mit Wasser gefülltes Standglas eingetragen wurde. Der schleimige, dunkelgraue Rückstand der Schmelze wurde absitzen gelassen und unter Dekantieren mehrfach mit Wasser ausgewaschen. Da die Flüssigkeit sich selbst bei mehrtägigem Stehen nicht klärte und die feineren suspendierten Teilchen von den gröberen abgegossen werden mußten, wurde die Ausfällung derselben in der abgegossenen Flüssigkeit durch einige Tropfen Natriumchloridlösung oder besser noch durch Zutröpfeln von n/10 Schwefelsäure in wenigen Minuten erzielt.

Der aufs sorgfältigste ausgewaschene Rückstand löste sich glatt in 5proz. Essigsäure[2]). Die gelbbraune Lösung schied bei Zusatz von Kalilauge einen voluminösen, fast ganz weißen Niederschlag ab, der unter Dekantieren ausgewaschen, mit absolutem Alkohol und Äther entwässert und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde.

Die Ausbeute des so erhaltenen amorphen Chitosans entsprach 30 (Lactarius volemus) bis 60 Proz. (Agaricus campestris) des zur Darstellung verwendeten Chitins. Die Ursache der Verschiedenheit der Ausbeuten trotz der genau eingehaltenen gleichartigen Verarbeitung blieb unerklärt. Es mußte sich wohl um einen teilweisen Zerfall des Chitins bei der Schmelze handeln, wobei man sich des Gedankens an einen verschiedenartigen Aufbau und eine dadurch bewirkte verschiedene Resistenz gegen Alkali der Chitine verschiedener Abkunft nicht erwehren kann.

---

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **27**, 3329. 1894.

[2]) Eine ganz geringe Menge verkohlter Teilchen konnte leicht abgetrennt werden.

Es ist schon bekannt[1]), daß Chitosan bei Einwirkung von salpetriger Säure unter Abspaltung von Stickstoff Chitose bildet. Nach der Methode von *van Slyke* konnte in den Chitosanpräparaten von Agaricus campestris und Lactarius volemus eine der Formel $(C_{28}H_{50}O_{19}N_4)x$ vollkommen entsprechende Aminostickstoffmenge nachgewiesen werden.

Agaricus campestris.

Je 0,0985 g Substanz gaben bei 750 mm und 15° in 10 Minuten 13,3 und 13,0 ccm N, enthielten demnach 7,65 und 7,48, im Mittel 7,56 Proz. Aminostickstoff.

Lactarius volemus.

Je 0,0725 g Substanz gaben bei 742 mm und 23° in 10 Minuten 10,2 und 10,0 ccm N und enthielten demnach 7,70 und 7,54, im Mittel 7,62 Proz. Aminostickstoff.

Berechnet für $(C_{28}H_{50}O_{19}N_4)x$ 7,51 Proz. $N\text{-}NH_2$.

Der ganze Stickstoff der Präparate mußte als Aminostickstoff vorgelegen haben.

Bei dem Mikronachweis nach *Brunswik* wurden aus den Präparaten des Chitins die charakteristischen Chitosansulfatkristalle erhalten. Die Substanz wurde eine halbe Stunde mit 50proz. Kalilauge bei 160° erwärmt. Nach Auswaschen des dabei gebildeten Chitosans wurde eine ganz geringe Menge desselben mit 1 bis 2 Tropfen 10proz. Schwefelsäure auf einen Objektträger gebracht, mit einem Deckglas bedeckt und vorsichtig bis zum schwachen Sieden gebracht, wobei sich die Substanz vollständig auflöste. Bei ganz langsamem Erkalten schieden sich die in Gestalt und Eigenschaften ganz genau von *Brunswik* beschriebenen viereckigen und biskuitförmigen Kristalle des Chitosansulfats aus.

Die von *Brunswik* nur für den mikrochemischen Nachweis angegebene Methode wurde weiter angewandt, um das Chitosansulfat in größerer Menge darzustellen, und zwar für Agaricus campestris und Armillaria mellea. Das Chitosan wurde bei 70 bis 80° im Wasserbade in 10proz. Schwefelsäure gelöst, heiß durch ein Asbestfilter filtriert und die wasserklare Lösung langsam erkalten gelassen. Dabei schied sich ein makroskopisch amorpher, mikroskopisch aber aus Kristallen von charakteristischem Aussehen[2]) bestehender weißer Niederschlag des Chitosansulfats aus. Nach dreimaligem Umkristallisieren wurden die Kristalle mit 10proz. Schwefelsäure, Wasser und Alkohol gewaschen, mit absolutem Alkohol und Äther entwässert und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Bei Armillaria entsprach die Ausbeute an Chitosan-

[1]) *Armbrecht*, diese Zeitschr. 95, 108, 1919.
[2]) *Brunswik*, a. a. O.; *Löwy*, diese Zeitschr. 23, 47, 1909.

sulfat 43 Proz. des ursprünglichen Chitins. Für Agaricus wurde die Ausbeute des Sulfats zu 105,2 Proz. des verwendeten Chitosans berechnet. Ein Teil des Chitosansulfats war in den Mutterlaugen zurückgeblieben.

Das Chitosansulfat aus Agaricus campestris wurde der Analyse unterworfen. Das Resultat derselben kann mit den von *Löwy* erhaltenen Zahlen verglichen werden.

	C Proz.	H Proz.	N Proz.	S Proz.	O Proz.
Agaricus campestris	32,16	5,13	5,25	9,59	47,87
Nephrops norvegicus (*Löwy*)	32,09	5,44	5,34	9,34	47,77
Berechnet für $C_{28}H_{50}N_4O_{19}(H_2SO_4)_3$ . .	32,31	5,38	5,38	9,23	47,70

0,1139 g Substanz gaben 0,1315 g CO_2 oder 32,11 Proz. C und 0,0526 g H_2O oder 5,27 Proz. H.

0,1090 g Substanz gaben 0,1288 g CO_2 oder 32,20 Proz. C und 0,0485 g H_2O oder 4,98 Proz. H.

0,0734 g Substanz gaben bei 745 mm und 20° nach *van Slyke* 6,9 ccm N oder 5,25 Proz. Aminostickstoff.

0,1804 g Substanz gaben 0,1260 g $BaSO_4$ oder 9,59 Proz. S.

Somit konnte aus Agaricus campestris, Lactarius volemus und Armillaria mellea nach dem Verfahren von *Scholl* reines Chitin dargestellt und sicher identifiziert werden. Die Ausbeute betrug dabei 2,8 bis 5,5 Proz. der Lufttrockensubstanz der Pilze.

Zugleich wird aber die gesamte Zellwandsubstanz der höheren Pilze auf 20 bis 44 Proz. geschätzt. Das Chitin bildet also nur einen geringen Anteil der Pilzzellwand und könnte demnach als eine Art von Inkrustation derselben angesehen werden. Es ist jedoch auch möglich, daß das Chitin in der Zellwand nicht im freien Zustande, sondern in enger chemischer Bindung mit anderen (Kohlenhydrat-) Gruppen vorkommt, wobei diese Bindung durch Behandlung mit heißen Laugen aufgelöst wird und das Chitin dann erst in freiem Zustande zum Vorschein kommt. Ob neben den im Chitin enthaltenen Glucosamingruppen noch andere Glucosamingruppen in Form von Chitinoiden[1]) in der Zellwand enthalten sind und ob der ganze Stickstoff derselben wirklich nur den Glucosamingruppen zuzuschreiben ist, sind Fragen, die in der vorliegenden Arbeit nicht berührt wurden. Ohne starken Laugeneingriff in die Zellwandsubstanz, der natürlich mit gewissen Zerstörungsprozessen verbunden ist, ist es uns unmöglich, weder Chitin, noch wohl andere glucosaminhaltige Polysaccharide nachzuweisen. Auch ist es einstweilen nur für die Myxomycetenfrucht-

[1]) *A. Kiesel*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 150, 1925.

wandung gelungen[1]), andere stickstoffhaltige Substanzen (Eiweiß) als Bestandteile derselben aufzufinden.

2. Polyporus betulinus.

Bei diesem Objekt gelang es nicht, unverändertes Chitin zur Abscheidung zu bringen. Statt des Chitins wurde hier nach der Methode von *Scholl* ein Körper oder eine Körpermischung isoliert, die außer glucosamin- auch glucosebildende Komplexe enthielt. Erst durch Verschmelzung mit Kalilauge gelang es, den Chitingehalt recht wahrscheinlich zu machen, indem Chitosan erhalten wurde[2]). Ob aber das Chitosan wirklich dem richtigen Chitin entstammte, kann noch nicht als endgültig nachgewiesen gelten.

Bei Verarbeitung von 50 g nach der Methode von *Scholl* resultierte eine 5 Proz. der Pilzsubstanz bildende weiße leichte pulverige Masse mit 0,4 Proz. Stickstoff, die gegen Salzsäure von 1,16 und gegen starke kalte Lauge resistent war. Bei Verarbeitung von 200 g, wobei das abwechselnde Behandeln mit Wasser und Lauge länger dauerte, entsprach der Rückstand 3 Proz. der Pilzsubstanz, enthielt jedoch schon 1,01 Proz. Stickstoff. Die Rückstände waren unlöslich in Kupferoxydammoniak und färbten sich gelbbraun von Jod und Schwefelsäure. Die mikrochemische Probe nach *Brunswik* ergab Kristalle von charakteristischer Quadrat- und Biskuitform, die sich mit Jod und Schwefelsäure rötlichviolett färbten; zugleich entstanden in geringer Menge größere Sphärite (5 bis 15 μ) mit feinem radialen Bau und lange dünne Nadeln. Beim Verschmelzen mit Kaliumhydrat nach *Hoppe-Seyler* wurde ein 10 bis 11 Proz. der verwendeten Substanz entsprechendes Produkt erhalten, das sich in verdünnten Säuren restlos auflöste[3]) und wieder durch Laugenzusatz ausgefällt wurde.

Somit mußte in beiden Fällen der Verarbeitung Chitosan gebildet worden sein. Leider können wegen eines Unfalls während der Verbrennung bei der nur sehr geringen Menge des erhaltenen Chitosansulfats, die nur zu einer Bestimmung ausreichte, keine analytischen Belege für die Substanz gegeben werden.

Neben dem chitosanbildenden Komplex konnten in dem nach *Scholl* dargestellten Präparate auch glucosebildende Komplexe nach-

---

[1]) *A. Kiesel*, a. a. O.

[2]) Es wurde schon von *Zellner* angegeben, daß die Methode von *Scholl* in manchen Fällen nicht zum Abtrennen von reinem Chitin führt.

[3]) Beim Verschmelzen mit Alkali erhielten *E. Winterstein* und *Gilson* aus den von ihnen dargestellten Pilzcellulosepräparaten aus Polyporus betulinus Substanzen, die nur teilweise in verdünnten Säuren löslich waren, wobei der unlösliche Teil aus stickstofffreien Kohlenhydraten bestand.

gewiesen werden. 0,8306 g wurden mit 5,75 ccm 70proz. Schwefelsäure 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Auffüllen bis 200 ccm wurde die Mischung 2 Stunden im kochenden Wasserbade, dann 2 Stunden im Autoklaven bei 120° erwärmt. Erst bei dem letzteren Verfahren löste sich der größte Teil der Substanz auf, jedoch blieben noch 0,2740 g ungelöst. Im aufgelösten Teile ließen sich 77,67 Proz. desselben als Polysaccharid durch Zuckerbestimmung berechnen. Das Präparat enthielt somit ein sehr schwer hydrolysierbares Polysaccharid. In der von der Zuckerbestimmung übriggebliebenen Lösung wurde nach Neutralisation mit Bariumcarbonat, Einengen zum Sirup, Aufnehmen in Alkohol, Abdampfen desselben und Aufnehmen in wenig Wasser durch Zusatz von essigsaurem Phenylhydrazin und ½stündiges Erwärmen ein Osazon erhalten, das nach Umkristallisieren sich bei 204 bis 205° zersetzte und somit Glucosazon war.

Ob beide Anteile, der chitosan- und der glucosebildende, ein Gemisch oder eine Verbindung miteinander bildeten, konnte nicht festgestellt werden.

Um eine gewisse Vorstellung über die neben dem Chitin in der Pilzzellwand eingeschlossenen Substanzen zu haben, wurde das erste alkalische Filtrat der Verarbeitung von Lactarius volemus verwendet.

Die durch ein Asbestfilter filtrierte Lösung bildete bei Neutralisation mit Salzsäure einen flockigen Niederschlag, der abfiltriert und mit Wasser sorgfältig ausgewaschen wurde. Das Filtrat wurde im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und mit dem mehrfachen Volumen 96proz. Alkohols versetzt. Es entstand ein flockiger Niederschlag, der etwa das 3½fache Gewicht des ersten hatte.

Der erste Niederschlag löste sich in warmer 10- bis 15proz. Natronlauge; 3- bis 10proz. Schwefelsäure löste ihn nur schwach beim Kochen auf. Er enthielt 0,31 Proz. Stickstoff. Nach fünfstündiger Hydrolyse mit 2,5proz. Schwefelsäure konnten 25,39 Proz. in Form von reduzierendem Zucker in der Lösung nachgewiesen werden. Aber auch bei starker Hydrolyse, die durch 12stündiges Stehenlassen mit 75proz. Schwefelsäure und Erwärmen im Autoklaven bei 120° bei einem Schwefelsäuregehalt von 2 Proz. bewirkt wurde, blieben noch etwa 9 Proz. ungelöst, wobei vom aufgelösten Teile 75,4 Proz. in Form von reduzierendem Zucker nachgewiesen werden konnten. Der gebildete Zucker gab ein Osazon, das sich bei 204 bis 205° zersetzte und demnach Glucosazon war.

Der zweite Niederschlag löste sich leicht in kalter 10- bis 15proz. Lauge und ziemlich leicht beim Kochen in 3proz. Schwefelsäure. Sein Stickstoffgehalt betrug 1,06 Proz. Eine zweistündige Hydrolyse mit

3 proz. Schwefelsäure ergab schon 44,42 Proz., eine fünfstündige 47,1 Proz. an reduzierendem Zucker. Die ganz wie bei dem ersten Niederschlag ausgeführte starke Hydrolyse ließ 52,9 Proz. Zucker nachweisen, der ein Osazon vom Zersetzungspunkt 204 bis 205°, also ein Glucosazon bildete.

Beide Polysaccharide unterschieden sich demnach durch ihr Verhalten gegen Säure: das erste war nur sehr schwer, das letzte viel leichter hydrolysierbar, wobei beide genügend resistent gegen 10 proz. Lauge waren, indem sie das Kochen mit derselben ertrugen und dabei in Lösung gegangen waren.

Beiträge zum Problem des Blutzuckers.

I. Mitteilung:

Über das Verhalten von Reduktion und Polarisation des Blutzuckers nach peroraler und intravenöser Glucosezufuhr.

Von

H. K. Barrenscheen, H. Kahler und **H. Hechl.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut und der III. medizinischen Klinik der Universität Wien.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1925.)

I.

Während die quantitative Seite des Blutzuckerproblems seit der Einführung der Mikromethoden eine weitgehende Klärung erfahren hat, ist die Literatur zur Frage der chemischen Natur des Blutzuckers eine relativ geringe geblieben, obzwar gerade diese Frage für Physiologie und Pathologie von größter Bedeutung ist. Sehen wir von den älteren Arbeiten ab, welche sich vorwiegend mit der Frage der Bindung des Blutzuckers und der sogenannten Restreduktion und deren Aufklärung befaßten[1]), so gebührt den Engländern *Winter* und *Smith*[2]) das Verdienst, in einer Reihe von experimentellen Arbeiten dem Problem nach der chemischen Natur des Blutzuckers systematisch mit neuer Methodik nachgegangen zu sein.

Anknüpfend an die — übrigens nicht bestätigte — Behauptung von *Hewitt* und *Pryde*[3]), daß α-β-Glucose bei der Berührung mit der Schleimhaut des normalen Darmes in die niedriger drehende γ-Glucose verwandelt werde, untersuchten *Winter* und *Smith* vergleichend Reduktion und Polarisation des Blutzuckers und fanden beim normalen Menschen und bei

---

[1]) Über die ältere Literatur vgl. *Stepp*, Ergebn. d. Physiol. 20, 1922; ferner das Referat von *Laquer*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 12 und 13.

[2]) Journ. of Physiol. 57, 100, 1922; Brit. med. Journ. 1923, S. 711, 894.

[3]) Biochem. Journ. 14, 395, 1920; vgl. dagegen *Stiven* und *Reid*, ebendaselbst 17, 556 bis 563, 1923.

verschiedenen Tieren den Reduktionswert höher als den Polarisationswert, der erst im Verlauf einiger Tage die Höhe des Reduktionswertes erreichte. Ganz anders lagen die Verhältnisse beim Diabetiker oder beim Normalen nach Injektion von Adrenalin: Hier war der Drehungswert höher als der Kupferwert, doch glich sich auch diese Differenz nach einigen Tagen aus, der Drehungswert sank allmählich auf die Höhe des Reduktionswertes ab. Auf Grund ihrer Befunde schlossen *Winter* und *Smith*, daß beim Normalen ein von der gewöhnlichen, im Gleichgewicht befindlichen α-β-Glucose verschiedener Zucker „reaktionsfähiger Natur“ kreise, während beim Diabetiker und nach Adrenalin die gewöhnliche α-β-Form vorhanden sein sollte. Ob diese reaktionsfähige Glucose mit der durch die Untersuchung von *Emil Fischer*[1]), sowie von *Irvine*[2]) und seinen Mitarbeitern auch für die Physiologie bedeutungsvoll gewordenen γ-Glucose identisch sei, wurde von den englischen Autoren nicht entschieden, die Möglichkeit jedoch auf Grund verschiedener Reaktionen als wahrscheinlich diskutiert.

Die Angaben von *Winter* und *Smith* wurden von verschiedenen Seiten nachgeprüft, doch war das Ergebnis durchaus kein einheitliches. Während auf der einen Seite *Eadie*[3]), *Macleod*[4]), *Nakahayashi* und *Abelin*[5]), die nach der Technik von *Winter* und *Smith* arbeiteten, die Befunde bestätigen konnten, kamen andere Autoren, wie *Thannhauser* und *Jenke*[6]), *van Crefeld*[7]), *Mozotowski*[8]), *Haldane*, *Wigglesworth* und *Woodrow*[9]), *Denis* und *Hume*[10]) zu absolut negativen oder ungleichmäßigen Resultaten. In einer vor kurzem erschienen Arbeit[11]) geben übrigens *Winter* und *Smith* selbst ihren bisherigen Standpunkt auf und kommen nach ihrer eigenen Methodik zu negativen Resultaten. Während *Hewitt*[12]) aus theoretischen Gründen die Auffassung von *Winter* und *Smith* durchaus ablehnt, wird von *Pringsheim*[13]) wiederum rein theoretisch der Standpunkt der beiden englischen Autoren verfochten und auch der Versuch einer strukturellen Formulierung des im Blute kreisenden Traubenzuckers unternommen, einer Formulierung als γ-Glucose mit einer 1—6-Sauerstoffbrücke, die unseren heutigen Kenntnissen vom Aufbau bzw. Abbau des Glykogens Rechnung tragen soll.

[1]) B. B. 47, 196 und 1980, 1915.
[2]) Journ. chem. Soc. London **107**, 524 und 541, 1915ff.
[3]) Amer. Journ. of Physiol. **68**, 513, 1923.
[4]) Lancet **205**, 198, 1923/II.
[5]) Diese Zeitschr. **147**, 544, 1924.
[6]) Münch. med. Wochenschr. **71**, 96, 1924.
[7]) Biochem. Journ. **17**, 860, 1923.
[8]) C. r. de la Soc. de biol **90**, 311, 1924.
[9]) Proc. of the Royal Soc. of London, Ser. B, **96**, Nr. B, 672, S. 15 bis 28, 1924. Während für die experimentelle Alkalosis die Polarisation stets höher als die Reduktion gefunden wurde, konnte bei experimenteller Acidosis kein Abweichen vom Verhalten gewöhnlicher α-β-Glucose festgestellt werden.
[10]) Journ. of biol. Chem. **60**, 603, 1924.
[11]) Proc. of the Royal Soc. of London, Ser. B, **97**, Nr. B 680, S. 20 bis 40, 1924.
[12]) Brit. med. Journ. 1923, S. 590; vgl. dazu die Entgegnung von *Winter* und *Smith*, ebendaselbst S. 894.
[13]) Diese Zeitschr. **156**, 109, 1925.

Eine experimentelle Stütze der ursprünglichen Angaben von *Winter* und *Smith* bilden auch die schönen nach Abschluß unserer Arbeit erschienenen Untersuchungen von *Lundsgaard* und *Holboll*[1]), die mit einer absolut schonenden Technik — Dialyse — gleichfalls die Differenz zwischen Drehung und Reduktion nachweisen konnten und für die Glucose des normalen Blutes eine spezifische Drehung zwischen 15,9 und 42,2° berechneten. Eine Identität mit einer der bisher strukturell aufgeklärten Glucoseformen wird von *Lundsgaard* abgelehnt, der normal im Blute kreisende Zucker mit dem neutralen Namen Neoglucose belegt.

Unsere eigenen Untersuchungen, die bereits seit 1½ Jahren abgeschlossen sind und deren Veröffentlichung aus äußeren Gründen bisher unterblieb, suchten die Frage von einem anderen Gesichtspunkt aus und mit geänderter Technik fortzuführen und einer Klärung näher zu bringen. Unterliegt der Traubenzucker, der normalerweise im Blute kreist, irgendwelchen Veränderungen, so mußten diese besonders klar zutage treten bei dem Vergleich des Blutzuckers nach peroraler und intravenöser Glucosezufuhr. Nach den experimentellen Beobachtungen von *Bang*[2]) und den Untersuchungen am Menschen von *Biedl* und *Kraus*[3]), *Falta* und *Bernstein*[4]) sind die Ausscheidungsverhältnisse für den verfütterten Traubenzucker ganz andere als für den intravenös zugeführten. Die Blutzuckerkurve nach intravenöser Injektion zeigt nach den Arbeiten von *Thannhauser* und *Pfitzer*[5]), *Jörgensen* und *Plum*[6]) beträchtliche Unterschiede gegen die Kurve der alimentären Hyperglykämie. Gleichzeitig begonnene eigene Untersuchungen über den Vergleich der Blutzuckerkurve und des Harnzuckers nach peroraler und intravenöser Verabreichung von Glucose bei Normalen und verschiedenen Kranken ergaben, daß nach intravenöser Injektion von 30 g Glucose in 50proz. Lösung meist recht bedeutende Zuckermengen mit dem Harn ausgeschieden werden, trotzdem der Blutzuckerspiegel nur relativ niedrige Werte erreicht, während das gleiche Individuum nach 100 g Glucose per os keine oder nur minimale Zuckerausscheidung im Harn bei beträchtlicher alimentärer Hyperglykämie zeigt. In diesem Verhalten glaubten wir eine Stütze für die Richtigkeit unserer Voraussetzung erblicken zu können. Von einem Vergleich beider Hyperglykämieformen hoffen wir aber auch Anhaltspunkte für die Auffassung vom Wesen der diabetischen Blutzuckervermehrung gewinnen zu können.

---

[1]) C. r. de la soc. biol. **92**, Nr. 2, S. 115 bis 116; Nr. 5, S. 395 bis 397; Nr. 7, S. 525 bis 527. Ugeskrift f. Laeger **87**, Nr. 10, S. 243 bis 250, 1925; Journ. of biol. Chem. **62**, 453 bis 469, 1925.
[2]) Der Blutzucker, S. 73 bis 83. Wiesbaden 1913.
[3]) Wien. klin. Wochenschr. 1896, S. 55.
[4]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **125**, 1916; **127**, 1918.
[5]) Münch. med. Wochenschr. 1913, Nr. 39, S. 2155.
[6]) Acta med. scandinavica **58**, 161, 1923.

II. Zur Technik der Versuche.

Gründe theoretischer und praktischer Natur veranlaßten uns, eine andere Methode zur Verarbeitung des Blutes als die von *Winter* und *Smith* benutzte auszuarbeiten. Der schwerwiegendste Einwand, der gegen die Angaben von *Winter* und *Smith* erhoben wird, daß nämlich ihre Befunde durch eine primäre Drehungsänderung bedingt seien, ist durch ihre Technik der Enteiweißung bedingt. Sie bedienten sich der Methode von *Folin* und *Wu*[1]), Fällung der Eiweißkörper bei schwefelsaurer Reaktion[2]). Nach ihren Angaben erhielten sie ein schwach saures Filtrat, und in dieser schwach sauren Reaktion sehen sie eine gewisse Sicherheit dafür, daß die eventuell vorhandene instabile reaktionsfähige Form des Traubenzuckers nicht zu rasch in die gewöhnliche Gleichgewichtsform der α, β-Glucose verwandelt wird. So richtig diese theoretische Überlegung an sich ist, so wenig darf übersehen werden, daß bei dem Einengen eines immerhin beträchtlichen Volumens bis nahe zur Trockne die anfänglich schwach saure Reaktion stark sauer werden muß und auch das Endfiltrat, das weniger als den zehnten Teil der Ausgangsmenge beträgt, diese stark saure Reaktion zeigt[3]). Insofern sind die Einwände von *Thannhauser* und *Jenke* berechtigt, sie vermögen aber keineswegs das von den englischen Autoren festgestellte verschiedene Verhalten des Blutzuckers von normalen und diabetischen Individuen zu erklären. Eine primäre Drehungsänderung müßte bei gleichbleibend saurer Reaktion stets in gleichem Sinne wirksam sein[4]).

Was wir von einer Abänderung der ursprünglichen Methode verlangen mußten, war zunächst, daß die normale p_H des Blutes beim Arbeiten nicht wesentlich geändert würde und auch das Ionenmilieu keine durch Zusätze bedingte Verschiebung erleide. Vom praktischen Standpunkt aus war zu berücksichtigen, daß das Einengen so großer wässeriger Flüssigkeitsmengen im Vakuum bei niedriger Temperatur wie es die Methodik von *Winter* und *Smith* verlangt, immer eine mißliche Sache ist, namentlich aber dort, wo ein möglichst rasches Verarbeiten des Materials geboten ist. *Nakahayashi* und *Abelin* sind aus diesem Grunde vom Vakuum abgekommen und haben ihre Filtrate im Luftstrom (Föhn) eingeengt.

---

[1]) Journ. of biol. Chem. 38, 90, 1919; 41, 367, 1920.

[2]) Bezüglich der Technik von *Winter* und *Smith* in ihren Einzelheiten vgl. Journ. of Physiol. 57, 100.

[3]) Vgl. dazu die Angaben von *Nakahayashi* und *Abelin*, l. c.

[4]) Nach den kürzlich erschienenen Untersuchungen von *Levene* und *Ulpts* (Journ. of biol. Chem. 64, 473, 1925) wäre übrigens auch an eine durch die Säurewirkung bedingte Kondensation von Glucosemolekülen zu denken.

Nach mehrfachen Versuchen, durch Enteiweißung mit Alkohol[1]) ans Ziel zu gelangen, haben wir schließlich folgenden Weg eingeschlagen, der uns in relativ kurzer Zeit zu vollkommen klaren und farblosen, absolut eiweißfreien Filtraten führte, deren p_H von Fall zu Fall nur innerhalb ganz geringer Grenzen schwankte.

Das Blut wurde aus der leicht gestauten Vene durch weite Kanülen direkt unter Rühren mit einem Glasstab in hohen Meßzylindern aufgefangen, die ein Gemisch von gleichen Teilen absoluten Alkohols und wasserfreien, reinen Acetons enthielten. Die Mengen waren so berechnet, daß — ohne Berücksichtigung der Kontraktion — auf 1 Teil Blut 4 Teile des Alkohol-Acetongemisches kamen, in der Regel 50 ccm Blut auf 200 ccm Alkohol-Aceton. Die Verwendung des Acetons zur Enteiweißung bringt zwei Vorteile für die weitere Verarbeitung mit sich: Bessere Fällung der Eiweißkörper und größere Flüchtigkeit des Acetons. Das verwendete Aceton war mehrfach rektifiziert, zum Teil über die Bisulfitverbindung gereinigt und absolut säurefrei. Filtriert wurde durch zwei übereinander geschaltete Trichter durch ein Faltenfilter und ein Blaubandfilter. Das Filtrat wurde im Vakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 30 bis 35° bis auf 5 bis 10 ccm eingeengt, der Rückstand in weite Reagenzgläser übergespült und der Kolben mehrmals mit wenigen Kubikzentimetern destillierten Wassers nachgespült. Das Gesamtvolumen des eingeengten Filtrats mit den Waschwässern betrug 15 bis 20 ccm. Die letzten Spuren von Eiweiß, sowie Fette, Lipoide und Farbstoffe wurden durch kolloidales Eisenhydroxyd entfernt, von dem 20 bis 25 Tropfen — etwa 1 bis $1\frac{1}{2}$ ccm — in allen Fällen ausreichten. Ein Zusatz von $MgSO_4$ zur vollkommenen Flockung des Eisens war überflüssig, der Elektrolytgehalt des eingeengten Blutfiltrats genügt vollkommen zur Erzielung eines grobflockigen Niederschlags. Das Filtrat von der Eisenfällung ist wasserklar, vollkommen farblos, seine p_H — bestimmt nach der kolorimetrischen Methode von *Michaelis* — lag in den extremsten Fällen bei 6,4 bzw. 7,0, durchschnittlich bei 6,6 und zeigte so eine annehmbare Konstanz. Da es uns nicht auf den absoluten Blutzuckerwert, sondern nur auf den Vergleich von Reduktion und Polarisation ankam, wurden die einzelnen Filtrate nicht gemessen. Das Endfiltrat wurde in allen Fällen in Meßkölbchen mit destilliertem Wasser auf 20 ccm aufgefüllt und sofort der Polarisation zugeführt. Vom Moment der Blutentnahme bis zur Polarisationsbestimmung vergingen 2 bis 3 Stunden, was eine wesentliche Abkürzung der Zeit gegenüber der Methodik von *Winter* und *Smith* bedeutet. Zur Polarisation wurde ein dreiteiliger Halbschattenapparat

[1]) Auch *Winter* und *Smith* versuchten auf Veranlassung von *Hopkins* die Enteiweißung mit Alkohol, sind jedoch wegen der Schwierigkeit der Entfernung der Fette und Lipoidsubstanzen davon abgekommen.

nach *Landolt* von *Schmidt* und *Haensch* verwendet, der eine Genauigkeit der Ablesung von $\pm 0{,}01^0$ erlaubt. Die Ablesungen erfolgten bei Natriumlicht, die Werte wurden aus dem Mittel von mindestens sechs Ablesungen berechnet. Zur Kontrolle wurden wiederholt Bestimmungen an Lösungen von reinem, wasserfreiem Traubenzucker ausgeführt, von denen drei als Beleg angeführt werden sollen.

Nr.	Zucker nach *Bertrand* Proz.	Polarisiert (Mittel aus 6 Ablesungen) Proz.	Differenz Proz.
1	0,190 0,191	0,190	± 0
2	0,170 0,170	0,171	+ 0,001
3	0,203 0,2035	0,209	+ 0,006

Wir halten uns daher berechtigt, über eine Abweichung von 6 mg-Proz. hinausgehende Werte als positive Resultate zu buchen.

Die Reduktion wurde nach der *Bertrand*schen Methode mit 10 bis 15 ccm des Endfiltrats bestimmt. Bei den Versuchen mit peroraler Darreichung von 50 bis 100 g Glucose erfolgte die Blutentnahme 3/4 bis 1 Stunde nach der Zuckeraufnahme, entsprechend dem Gipfel der in der Mehrzahl der Fälle gleichzeitig festgelegten Blutzuckerkurve. Zur intravenösen Injektion verwendeten wir eine 50proz. Traubenzuckerlösung, von der 60 ccm, entsprechend 30 g Glucose, rasch injiziert wurden. In diesen Fällen erfolgte die Blutentnahme 15 bis 20 Minuten nach Beendigung der Injektion, zu einer Zeit, die nach unseren Untersuchungen dem Maximum des Blutzuckerspiegels entspricht. Unangenehme Nebenerscheinungen, wie Schüttelfrost usw., wurden im Anschluß an die Injektionen nie beobachtet.

III. Untersuchungen an Normalen und an nicht diabetischen Kranken.

Das Verhältnis von Reduktion und Polarisation wurde zunächst an vier Normalen (zwei Frauen und zwei Männern) 16 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme untersucht.

Das Ergebnis, das in Tabelle I zusammengestellt ist, war in allen Fällen das gleiche. Der Polarisationswert liegt durchweg beträchtlich unter dem Reduktionswert und beträgt in Prozenten des Reduktionswertes für die einzelnen Fälle 67,8, 65,28, 49,4 und 73,08 Proz., im Mittel der vier Versuche 63,89 Proz. Noch klarer wird die Differenz, wenn wir unter Zugrundelegung des Reduktionswertes die spezifische Drehung aus den abgelesenen Polarisationswerten berechnen, wie dies in Kolumne 5 der Tabelle geschehen ist. Statt der für α, β-Glucose

Tabelle I.
Untersuchungen an nüchternen Normalen.

1	2	3	4	5	6	7
		Blutzucker				
Nr. und Name	Glucosezufuhr	Reduktionswert Proz.	Polarisationswert Proz.	Spezifische Drehung aus der abgelesenen Drehung u. d. Reduktionswert berechnet °	Polarisationswert des Reduktionswertes Proz.	Anmerkung
1 *Sih.*	0	0,132	0,089	35,6	67,8	p_H des Endfiltrats 6,8
2 *Lack.*	0	0,108	0,070	34,3	65,28	„ „ „ 6,6
3 *Lec.*	0	0,085	0,042	25,7	49,4	„ „ „ 6,8
4 *Czel.*	0	0,130	0,095	38,5	73,08	„ „ „ 6,9

geforderten 52,5° finden wir hier Drehungswerte zwischen 25,7 und 38,5°, Werte, die mit den von *Lunsgaard* und *Holboll* angegebenen, nach anderer Methodik gewonnenen, vortrefflich übereinstimmen.

Nach peroraler Zufuhr von 50 bis 100 g Glucose wurden 13 Fälle untersucht. Sämtliche Versuchspersonen waren hier aus äußeren Gründen Frauen. Alle Altersstufen zwischen 20 und 70 Jahren sind vertreten. Der Zucker wurde durchweg nüchtern, in Tee aufgelöst, verabreicht.

Als normal läßt sich das Material zum Teil durchaus nicht ansprechen. Mußten wir doch mit Rücksicht auf die relativ großen Blutmengen, die wir benötigten, die Versuche auch dort anstellen, wo die Venaepunctio als therapeutischer Eingriff gerechtfertigt war. Diese Ungleichheit des Materials bedingt wohl auch die ungleichmäßigen Ergebnisse dieser Versuchsreihe, die in Tabelle II zusammengestellt sind. In acht von den untersuchten Fällen — Nr. 5, 7, 8, 9, 11, 14, 15, 16 der Tabelle II — bietet sich nach peroraler Zufuhr von 50 bis 100 g Glucose auf der Höhe der Hyperglykämie das gleiche Verhalten von Polarisation und Reduktion, wie wir es beim nüchternen Normalen gefunden haben. Die Polarisationswerte betragen zwischen 53,3 bis 93,4 Proz. des Reduktionswertes, im Durchschnitt 74,2 Proz., liegen also höher als die beim Nüchternen beobachteten Werte. Entsprechend verschieben sich auch die Werte für die spezifische Drehung, die zwischen 32 und 50,3° liegen, der Durchschnittswert beträgt hier 40,2 gegen 33,5° in den Nüchternversuchen. In fünf Fällen wurde auch analog den Untersuchungen von *Winter* und *Smith* die Drehungsänderung des Endfiltrats durch mehrere Tage hindurch beobachtet. Unsere Ergebnisse decken sich hier mit den Angaben von *Winter* und *Smith*.

Der dem Reduktionswert entsprechende Drehungswert wurde ers nach 2 bis 4 Tagen erreicht, zweimal wurden am vierten Tage soga höhere Werte, als die Reduktion sie anzeigte, abgelesen. Das folgend Beispiel, das wir aus Gründen der Raumersparnis allein anführen illustriert sehr schön eine solche Beobachtungsreihe.

Tabelle II.

Untersuchungen nach peroraler Glucosezufuhr.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. und Name	Glucose-zufuhr g per os	Blutzucker Reduktionswert Proz.	Blutzucker Polarisationswert Proz.	Spezifische Drehung aus der abgelesenen Drehung u. d. Reduktionswert berechnet °	Polarisationswert des Reduktionswertes Proz.	Anmerkung
5 *Char.*	100	0,317	0,266	44,2	83,9	p_H des Endfiltrats 6,8 Harn: Zucker θ
6 *Wor.*	100	0,152	0,152	—	100	p_H des Endfiltrats 6,4 Harn: Zucker θ
7 *Wal.*	100	0,175	0,107	32	61,14	p_H des Endfiltrats 6,7 Harn: Zucker θ
8 *Wi.*	100	0,122	0,114	50,3	93,4	p_H des Endfiltrats 6,6 Harn: Zucker, Spuren
9 *Bla.*	100	0,100	0,054	35,3	53,3	p_H des Endfiltrats 6,8 Harn: Zucker θ
10 *Sche.*	100	0,190	0,190	—	100	p_H des Endfiltrats 6,6 Harn: Zucker, Spuren
11 *Ger.*	100	0,170	0,154	47,6	90,5	p_H des Endfiltrats 6,7 Harn: Zucker θ
12 *Schn.*	100	0,105	0,104	—	100	p_H des Endfiltrats 6,7 Harn: Zucker θ Chron. paren. Nephritis. Albumen 20 Proz.!
13 *Kri.*	100	0,095	0,110	61,0	115,9	p_H des Endfiltrats 6,9 Harn: Zucker, Spuren Schrumpfniere. Blutdruck 210–230 mm Hg.
14 *Bib.*	100	0,161	0,108	35,4	67,08	p_H des Endfiltrats 6,8 Harn: Zucker θ
15 *Ed.*	50	0,187	0,158	44,4	84,5	p_H des Endfiltrats 6,7 Harn: Zucker θ
16 *Pra*	50	0,213	0,131	32,3	61,5	p_H des Endfiltrats 6,8 Harn: Zucker θ Sek.-Schrumpfniere
17 *Smet.*	50	0,102	0,097	—	100	p_H des Endfiltrats 6,5 Harn: Zucker θ Albumen + Mitral- u. Aortenstenose, Stauungsleber

Fall *Wall* (siehe Tabelle II, Nr. 7). Versuch am 23. April 1924.

Reduktionswert	. . . .	0,175 Proz.
Polarisationswert	23. IV. 12 Uhr mittags	0,107 „
„	23. IV. 6 Uhr nachmittags . . .	0,107 „
„	24. IV.	0,118 „
„	25 IV.	0,135 „
„	26. IV.	0,190 „

Der am vierten Tage abgelesene Polarisationswert übersteigt den Reduktionswert um rund 8,5 Proz. Bemerkenswert ist, daß der Anstieg nicht gleichmäßig, sondern in den ersten Tagen ganz allmählich, vom dritten zum vierten Tage sehr steil erfolgt. Das gleiche Verhalten fanden wir auch in unseren anderen Beobachtungen. Ein Schwanken der Polarisationswerte um eine Mittellage, wie es von *Nakahayashi* und *Abelin* beobachtet wurde, konnten wir in keinem Falle feststellen.

Von den restlichen fünf Fällen war der Polarisationswert viermal gleich (Fälle 6, 10, 12 und 17), einmal (Fall 13) lag derselbe über dem Reduktionswert. Wie läßt sich ein solches abweichendes Verhalten erklären? Für einen Teil der Fälle (Nr. 13 und 17 der Tabelle II) kann man ungezwungen nach dem klinischen Befund auf eine verminderte Toleranz für alimentäre Belastung mit Traubenzucker schließen[1]). Eine Erklärung, die alle Fälle umfaßt, ergibt sich vielleicht aus dem Vergleich der Befunde bei Nüchternen und nach Zuckerbelastung unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Zuckerausscheidung durch den Harn. Der Polarisationswert bei Nüchternen liegt durchschnittlich niedriger als der nach Traubenzuckereingabe beobachtete. Die spezifische Drehung beträgt im Durchschnitt bei den Nüchternfällen 33,5°, bei den Fällen mit alimentärer Hyperglykämie 40,2°. Dieser höhere Wert könnte nun seine Erklärung darin finden, daß noch nicht in den körpereigenen, niedriger drehenden Zucker umgewandelte α, β-Glucose ins Blut übertritt. Dort, wo diese Mengen gering geblieben sind, wird sich der Polarisationswert gegenüber den bei Nüchternen erhobenen Befunden nicht wesentlich ändern (siehe Fälle 7, 9, 14 und 16 der Tabelle II). In dem Maße, als die Umwandlung in körpereigenen Zucker mit der Resorption nicht Schritt halten kann, steigt der Polarisationswert (s. Fälle 5, 8, 11 und 15), bis schließlich die Niere den körperfremden Zucker nicht mehr zurückhalten kann und es zur Glykosurie kommt[2]). Der Vergleich zwischen Reduktion und Polarisation könnte so vielleicht eine noch feinere Prüfung der Zuckertoleranz sein als die Probe auf alimentäre

[1]) Vgl. dazu die Ergebnisse von *Haldane*, *Wiggleworth* und *Woodrow* (l. c.), die bei experimenteller Alkalosis neben *verminderter Toleranz* für alimentäre Belastung mit 100 g Glucose eine *Erhöhung* der *Polarisationswerte* des Blutzuckers gegen die Reduktionswerte feststellen konnten.

[2]) Vgl. dazu die Untersuchungen von *Hamburger*, Klin. Wochenschr. **1**, Nr. 9, S. 418, 1922.

Glykosurie. So finden wir im Fall 8 bei einer spezifischen Drehung vo 50,3° im Harn bereits Zucker, die Blutentnahme scheint hier kurz vo dem kritischen Punkt erfolgt zu sein. Die fehlende Glykosurie in de Fällen 13 und 17 findet unschwer ihre Erklärung in dem klinische Befund — schwere Nierenerkrankung bzw. Kreislaufstörung. Wi sind weit entfernt, aus unserem immerhin nicht zu großen Materia weitgehende Schlüsse theoretischer Natur ziehen zu wollen, glaube aber, daß die gegebene Erklärung am ehesten mit unseren theoretische Vorstellungen vom Zuckerstoffwechsel und den vorliegenden Tatsachen in Einklang steht. Eine Stütze für unsere hier vertretene Anschauung sind auch die Ergebnisse der Untersuchungen nach intravenöser Injektion von hochprozentiger Glucoselösung.

Tabelle III.

Untersuchungen nach intravenöser Glucosezufuhr.

Die Nummern der Versuche entsprechen den Patienten in Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. und Name	Glukosezufuhr g intravenös	Blutzucker Reduktionswert Proz.	Blutzucker Polarisationswert Proz.	Spezifische Drehung aus der abgelesenen Drehung u. d. Reduktionswert berechnet °	Polarisationswert des Reduktionswertes Proz.	Anmerkung
6a *Wor.*	30	0,306	0,342	58,5	112	p_H des Endfiltrats 6,5 Harn: Zucker 3,8 g
7a *Wal.*	30	0,079	0,129	86,3	164	p_H des Endfiltrats 6,8 Harn: nicht untersucht
8a *Wi.*	30	0,210	0,230	57,9	109	p_H des Endfiltrats 6,8 Harn: Zucker 1,4 g
9a *Bla.*	30	0,175	0,171	—	100	p_H des Endfiltrats 6,6 Harn: Zucker 3,3 g
11a *Ger.*	30	0,110	0,133	63,6	121	p_H des Endfiltrats 6,8 Harn: Zucker 4,8 g
13a *Kri.*	30	0,170	0,209	64,7	123	p_H des Endfiltrats 6,4 Harn: Zucker 0,9 g
15a *Ed.*	30	0,163	0,352	113,5	215,9	p_H des Endfiltrats 6,8 Harn: Zucker 5,4 g
16a *Pra.*	30	0,303	0,274	46,8	90	p_H des Endfiltrats 6,6 Harn: Zucker, Spuren, quantitativ nicht bestimmbar
17a *Smet.*	30	0,223	0,331	78	148,5	p_H des Endfiltrats 6,5 Harn: Zucker 2,2 g

Die in dieser Reihe angeführten Fälle wurden sämtlich auch nach peroraler Zufuhr von Glucose untersucht, so daß ein einwandfreier Vergleich zwischen den Werten möglich ist.

Das Ergebnis überrascht nun bis zu einem gewissen Grade. Man sollte annehmen, daß bei einer plötzlichen Überschwemmung der Blutbahn mit großen Mengen von α, β-Glucose diese auch im optischen Verhalten des Blutzuckers zum Ausdruck kommen muß, da ja der regulatorische und assimilatorische Einfluß der Leber und der Gewebe sich nur allmählich auswirken kann. Statt dessen finden wir nur in einem Versuch (Nr. 9a der Tabelle III) den Drehungswert identisch mit dem Reduktionswert — auf Fall 16a, bei welchem der Polarisationswert unter dem Reduktionswert liegt, soll später eingegangen werden —, während in sieben Fällen der gefundene Wert für die spezifische Drehung weit über dem erwarteten Gleichgewichtswert der α, β-Glucose liegt und in einem Falle (Nr. 15a) mit einer spezifischen Drehung von 113,5° einen Wert erreicht, der die für reine α-Glucose berechnete Drehung von 110° noch um einiges überschreitet. Die Polarisationswerte liegen in diesen sieben Versuchen zwischen 57,9 und 113,5°, der Durchschnittswert ist 74,6°, in Prozenten des Reduktionswertes berechnet, liegen die Zahlen für die Drehungswerte zwischen 109 und 215,9 Proz., im Durchschnitt 143 Proz. Entsprechend den Versuchen nach peroraler Glucosezufuhr wurde in fünf Fällen die Drehungsänderung des Endfiltrats verfolgt, der Reduktionswert wurde in vier Versuchen nach 2 Tagen, in einem nach 3 Tagen erreicht. In diesem Falle war analog dem beschriebenen Verhalten bei peroraler Zufuhr der Abfall am ersten Tage nach dem Versuch nur gering, der weitere Abfall bis zu dem Reduktionswert erfolgte steil mit einem deutlichen Knick der Kurve. Unter den Reduktionswert sahen wir den Polarisationswert nie herabgehen.

Eine Erklärung für dieses Verhalten ist bei dem heutigen Stande unseres Wissens schwer zu geben, können wir doch nicht einmal mit Sicherheit sagen, worauf das abnorme Drehungsvermögen des Blutzuckers unter normalen Verhältnissen beruht, ob hier eine bisher unbekannte körpereigene Struktur des Traubenzuckers vorliegt, oder ob ein Teil des Zuckers in irgend einer lockeren reaktionsfähigen Bindung, eventuell an Phosphorsäure, im Blute kreist. Legt man die Annahme, daß wir es im Blute mit einem Traubenzucker unbekannter, körpereigener Struktur zu tun haben, der Betrachtung zugrunde, so ließen sich die abnorm hohen Zahlen, welche bei intravenöser Injektion gefunden wurden, so erklären, daß die körpereigene Struktur über eine höherdrehende Form der Glucose, eventuell α-Glucose, erreicht wird. Diese Annahme könnte zwar in den Angaben von *Thannhauser* und *Jenke* über die Ausnutzung der α- bzw. β-Glucose durch den Diabetiker eine Stütze finden, ist jedoch mit unseren Ergebnissen schwer in Einklang zu bringen, da gerade der Fall mit den höchsten Polarisationswerten die höchste Zuckerausscheidung zeigt. Unsere Befunde beim Diabetiker

(s. unten) sprechen ebensowenig in diesem Sinne. Auch an die Möglichkeit einer rasch einsetzenden Polymerisation als Ursache der abnorm hohen Drehung wäre zu denken. Eine, wenn auch nicht durchgehend zu beobachtende Parallelität zwischen der Höhe der Zuckerausscheidung und der Höhe der Drehung läßt daran denken, daß die Polarisationswerte einen Ausdruck für die Raschheit und Intensität der Regulations- und Assimilationsfähigkeit des Organismus darstellen: Niedrige Werte sprächen für eine gute, höhere Werte für eine herabgesetzte Assimilation. So ließe sich auch der ganz aus dem Rahmen fallende Fall 16a erklären, bei dem der Polarisationswert unter dem Reduktionswert gefunden wurde, und der als einziger Fall einer größeren Reihe von Untersuchungen nach intravenöser Injektion von 30 g Glucose nur quantitativ nicht bestimmbare Spuren Zucker ausschied. Bezeichnenderweise zeigt dieser Fall ebenso wie Fall 9a, bei dem die Polarisation mit der Reduktion identische Werte ergab, nach peroraler Zuckerbelastung die niedrigsten in unserer Versuchsreihe beobachteten Werte — spezifische Drehung = 32,4 bzw. 32,0° —, Befunde, die gleichfalls für eine Beziehung zwischen Assimilationsfähigkeit und Höhe der beobachteten Drehung sprechen.

IV. Untersuchungen an Diabetikern.

Zur Untersuchung gelangten acht Fälle, die bis auf einen (Nr. 19 der Tabelle IV) sämtlich Frauen waren. Vertreten sind alle Typen des Diabetes, von den leichtesten Formen hinauf bis zum schweren Diabetes mit hochgradiger Acetonurie.

In zwei Fällen wurde das Blut nur im Nüchternzustande untersucht, sonst nüchtern und nach alimentärer Belastung mit 50 bzw. 100 g Glucose. Ein Fall (Nr. 25) wurde auch nach intravenöser Zuckerinjektion untersucht. Zum Teil standen die untersuchten Kranken neben der diätetischen auch unter Insulinbehandlung.

Betrachten wir zunächst die Nüchternwerte, so finden wir mit Ausnahme des Falles 25, der als insulinrefraktär eine Sonderstellung einnimmt und für sich betrachtet werden soll, durchweg Abweichungen vom Verhalten des Normalen. Die Polarisationswerte entsprechen entweder den Reduktionswerten (Fälle 18, 21, 22, 23, 24) oder liegen beträchtlich über diesen (Fälle 19, 20). Nach alimentärer Zufuhr von Glucose ist das Verhalten ein völlig einheitliches. Durchweg liegt der Polarisationswert beträchtlich über dem Reduktionswert, die spezifische Drehung beträgt im Durchschnitt 65,7°. Auch hier wurde analog den Versuchen beim Normalen das Verhalten der Polarisation durch mehrere Tage hindurch beobachtet. Unter fünf Beobachtungen wurde der Abfall auf den Reduktionswert dreimal am zweiten Tage, zweimal am dritten Tage nach dem Versuch festgestellt. Irgendwelche

Tabelle IV.

Untersuchungen an Diabetikern.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. und Name	Glucosezufuhr	Blutzucker Reduktionswert Proz.	Blutzucker Polarisationswert Proz.	Spezifische Drehung aus der abgelesenen Drehung u. d. Reduktionswert berechnet °	Polarisationswert des Reduktionswertes Proz.	Anmerkung
18 *Ros.*	nüchtern	0,143	0,148	—	100	p_H des Endfiltrats 6,7 Diabetes levis. Myodegeneratio cordis. Nüchternblutzucker 0,120 Proz.
19 *Hoi.*	nüchtern	0,147	0,190	68,0	129	p_H des Endfiltrats 6,8 Pankreatitis, Diabetes. Nüchternblutzucker 0,153 Proz.
20a *Kre.*	nüchtern	0,193	0,253	68,9	131	p_H des Endfiltrats 6,4
20b	50 g per os	0,503	0,533	55,7	106	p_H des Endfiltrats 6,4 Mittelschwerer Diabetes bei gemischter Kost 70—100 g Glucose im Harn. 2 Tage vor der Untersuchung 30—50 E. Insulin. Nüchternblutzucker 0,190 Proz.
21a *Böh.*	nüchtern	0,148	0,142	—	100	p_H des Endfiltrats 7,0
21b	50 g per os	0,275	0,424	81,1	154	p_H des Endfiltrats 6,4 Diabetes seit 15 Jahren, bis 8 Tage vor der Untersuchung täglich 20 E. Insulin. Durchschnittliche Zuckerausscheidung 10—20 g. Nüchternblutzucker 0,190 Proz.
22a *Bar.*	nüchtern	0,276	0,272	—	100	p_H des Endfiltrats 6,8
22b	100 g per os	0,420	0,484	60,5	115	p_H des Endfiltrats 6,4 Diabetische Symptome seit einem Jahr. Durch 8 Tage vor den Versuchen täglich 30 E. Insulin. Zuckerausscheidung 40—60 g. Nüchternblutzucker 0,200 Proz.

Tabelle IV. (Fortsetzung.)
Untersuchungen an Diabetikern.

1	2	3	4	5	6	7
		Blutzucker				
Nr. und Name	Glucosezufuhr	Reduktionswert Proz.	Polarisationswert Proz.	Spezifische Drehung aus der abgelesenen Drehung u. d. Reduktionswert berechnet °	Polarisationswert des Reduktionswertes Proz.	Anmerkung
23a *Ens.*	nüchtern	0,242	0,236	—	100	p_H des Endfiltrats 6,5
23b	100 g per os	0,480	0,503	55,0	105	p_H des Endfiltrats 6,6 Diabetes unbekannter Dauer, bei gemischter Kost 60—80 g Dextrose im Harn. Nüchternblutzucker 0,180 Proz. Insulinbehandlung auch an den Versuchstagen
24a *Schn.*	nüchtern	0,108	0,104	—	100	p_H des Endfiltrats 6,4
24b	50 g per os	0,192	0,278	76,04	145	p_H des Endfiltrats 6,5 Diabetes levis. Durchschnittl. Zuckerausscheidung 0—6 g. Nüchternblutzucker 0,110 Proz.
25a *Mo.*	nüchtern	0,293	0,278	49,8	95	p_H des Endfiltrats 6,5
25b	50 g per os	0,423	0,423	—	100	p_H des Endfiltrats 7,0
25c	30 g intravenös	0,281	0,300	55,8	107	p_H des Endfiltrats 6,4 Diabetes gravis. Acetonurie. Insulin täglich 30—50 E. ohne Einfluß auf Glykosurie und Ketonurie. Nüchternblutzucker 0,280 Proz.

Besonderheiten ergaben sich hier nicht, auch in diesen Fällen vermißten wir Schwankungen oder Herabgehen unter die durch die Reduktion gefundenen Werte.

Wir beobachten also beim Diabetiker nach peroraler Belastung mit Glucose die gleichen Verhältnisse des Blutzuckers, wie sie der Normale nach Überschwemmung der Blutbahn mit α, β-Glucose zeigt. Es wäre verlockend, aus dieser Tatsache nun Schlüsse über das Wesen des Diabetes zu ziehen; wir glauben jedoch, daß unser hier gebrachtes Material — von der Fülle ungeklärter Probleme und der Vieldeutigkeit, die dieses Verhalten des Blutzuckers in sich birgt, ganz abgesehen —

nicht die genügende Tragfähigkeit besitzt, um darauf weitgehende Theorien aufzubauen, sondern begnügen uns vorläufig mit der Feststellung der Tatsache an sich.

Einer gesonderten Besprechung bedarf noch Fall 25, der gänzlich aus der Reihe der von uns bei den übrigen Diabetikern gefundenen Tatsachen herausfällt. Hier sehen wir nüchtern und nach peroraler Zufuhr ein Verhalten, wie es uns auch der Nichtdiabetische gezeigt hat. Auch die Werte nach intravenöser Injektion von Glucose entsprechen diesem. Die Tatsache, daß der Fall jeglicher Insulinbehandlung trotz erheblicher Steigerung der Dosen trotzte, weist ihm eine Ausnahmestellung gegenüber den übrigen Fällen dieser Versuchsreihe zu. Solche insulinrefraktäre Fälle sind ja in der letzten Zeit mehrfach beschrieben worden. Für sie gilt die Annahme, daß die diabetische Stoffwechselstörung nicht auf einen Ausfall des Pankreashormons zurückzuführen ist, sondern ihre Ursache in anderen, nicht näher bekannten Faktoren zu suchen ist. Wir glauben nicht fehlzugehen, wenn wir auch unseren Fall in diese seltenen insulinrefraktären Fälle einreihen und so seine Besonderheit erklären.

V. Zusammenfassung.

1. Beim nüchternen Normalen liegt der Polarisationswert für den Blutzucker beträchtlich unterhalb der durch die Reduktion bestimmten Werte. Die spezifische Drehung berechnete sich auf 25,7 bis 38,5°.

2. Nach Nüchternbelastung mit 50 bis 100 g Glucose zeigen 8 von 13 Fällen das gleiche Verhalten wie der nüchterne Normale, doch liegen die berechneten Drehungswerte durchschnittlich etwas höher. Die Differenz zwischen Polarisation und Reduktion gleicht sich im Verlauf von 2 bis 4 Tagen aus.

3. Nach intravenöser Injektion von 30 g Glucose ist der Polarisationswert in sieben von neun Fällen beträchtlich höher als der Reduktionswert.

4. Beim Diabetiker ist, von einem insulinrefraktären Falle abgesehen, der Nüchternwert des Blutzuckers nach der Polarisationsbestimmung dem Reduktionswert gleich oder höher als dieser.

5. Nach alimentärer Belastung mit 50 bis 100 g Glucose verhält sich der Blutzucker des Diabetikers gleich dem des Normalen nach intravenöser Zuckerinjektion. Die durch Polarisation gefundenen Werte übersteigen die durch Reduktion ermittelten um ein Beträchtliches.

6. Eine primäre Drehungsänderung läßt sich für unsere Ergebnisse nicht verantwortlich machen, da bei der verwendeten Technik eine weitgehende Konstanz der p_H erzielt wurde.

Ionen-Dyskrasie.
Ein graphisches Hilfsmittel zum Studium der Folgen von Gleichgewichtsstörungen in der Ionenzusammensetzung biologischer Salzlösungen.

Von

S. Loewe.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Dorpat.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Wie eine Änderung des „Salzmediums" auf den Ablauf eines Lebensvorgangs wirkt, wird auch künftig noch in vielen Versuchsreihen studiert werden müssen, ehe die Gesamtheit der Fragen dieses großen Gebiets beantwortet sein wird. Die Vielheit der Veränderlichen, die der Gesamtbegriff „Salzmedium" umfaßt, bringt es mit sich, daß die Ergebnisse der Bearbeitung auch schon einer einzelnen enger umgrenzten Teilfrage nur schwer übersichtlich darzustellen sind und daß vollends mehrere Untersuchungen einer gleichgearteten Frage oft gar nicht mehr miteinander in Vergleich gesetzt werden können. Vielleicht kann daher die Bekanntgabe eines einfachen Hilfsmittels, das ich seit langem mit Vorteil zur Veranschaulichung mancher Erscheinungen aus dem Fragengebiet des „Ionengleichgewichts" und zur Aufstellung von Arbeitsplänen benutze, auch dem einen oder anderen der vielen Bearbeiter solcher Fragen dienlich sein.

Zwei Gruppen von Aufgaben sind es, die hier unterschieden werden müssen: Die Störungen, die das physiologische Geschehen von seiten des Salzmediums erfährt, können entweder auf dessen *mengenmäßig* abweichender *Gesamtkonzentration* (Hypotonie, Hypertonie, zusammenfassend Anisotonie oder kürzer „Dystonie") beruhen, oder aber auf der *artmäßig* abweichenden Zusammensetzung seiner *Mischung*, einer Störung seiner „**Eukrasie**". Die Erforschung von Störungen der zweiten Art, also der „**Dyskrasien**" steht, während die Rolle der Dystonie schon früher und leichter Bearbeitung finden konnte, heute im Mittelpunkt der Aufmerksamkeit, und gerade auf diesem zweiten Gebiet

macht sich die Zahl der Variablen besonders stark geltend. Kann doch das *„eukrate“* Gleichgewicht der Bestandteile durch ein Zuviel oder Zuwenig auch nur eines einzelnen Ions bei Wahrung der „Eutonie“ des Ganzen nicht ohne gegensinnige Änderung in der Menge der anderen Bestandteile „desäquilibriert“ werden. Man muß sich also, gleichviel, ob man die Rolle eines Kations, Anions oder im besonderen des H^+ als unabhängiger Variablen in einem solchen „Desäquilibrium“ zu studieren beabsichtigt, darüber klar sein, welche Folgen diese Störung gerade im Rahmen gewissenhaft aufrecht erhaltener Eutonie an den übrigen Bestandteilen des Salzmediums nach sich zieht.

Der Veranschaulichung der Verhältnisse solcher Fälle dient unser Hilfsmittel, das, da es auf derartige Änderungen des gegenseitigen Mischungsverhältnisses der Ionen unter der Voraussetzung voller Aufrechterhaltung der Eutonie Anwendung findet, als *„Nomogramm der Ionendyskrasie“* bezeichnet werden mag. Es gilt in der von uns gehandhabten Form zunächst für *„ternäre* Ionendyskrasien“, d. h. es faßt nur die Mischungsmöglichkeiten zwischen je drei Ionenbestandteilen des viel komplexeren Gesamtgemisches ins Auge, kann aber in sinngemäßer Änderung auch anderen, und zwar auch umfassenderen Betrachtungen zur Grundlage dienen. Es soll an Hand seiner Anwendung auf die Mischungsmöglichkeiten derjenigen drei Kationen dargestellt werden, die bei solchen Betrachtungen heute wohl mit Recht die größte Beachtung erfahren, des Na^+, K^+ und Ca^{++}.

Aufgabe ist es, alle Variationsmöglichkeiten zwischen diesen drei Ionen darzustellen, die gegeben sind, wenn einerseits die Gesamtkonzentration des Salzgemisches (c), andererseits die Konzentration seiner übrigen Bestandteile ($c - k$) unverändert bleiben soll. Zieht man die Summe der Konzentrationen aller dieser Restbestandteile von der eutonischen Gesamtkonzentration ab, so verbleibt die Eutoniekonstante des ternären Kationensystems (k), es ist: $[K^+] + [Na^+] + [Ca^{++}] = k$.

Die Variationen, welche das gesamte ternäre Gemisch durchlaufen muß, wenn jeder seiner Salzbestandteile sich zwischen 0 und 100 Proz. k ändert, können dann in einem trigonalen gleichseitigen Koordinatensystem zur Darstellung gebracht werden, das man sich konstruieren kann, indem man in den Ecken eines gleichseitigen Dreiecks A, B und C von der Seitenlänge $= k\sqrt{1{,}33}$ im gleichen Uhrzeigersinne je eine Senkrechte AA', BB' und CC' von der Länge k auf den angrenzenden Seiten AC bzw. AB bzw. BC errichtet. AA', BB' und CC' können dann als Natrium-, Kalium- und Calciumordinate gewählt und in gleiche Bruchteile der eutonischen Konzentration k zerlegt werden, die rechtwinklig angrenzenden Dreieckseiten sind die zugehörigen Nullabszissen (AC für Na^+, AB für K^+ und BC für Ca^{++}). Alle im Rahmen

von k möglichen Mischungen liegen dann im Bereich der Dreieckfläche auf den sich trigonal schneidenden Parallelenscharen zu den Abszissenachsen. Wird die Konzentration eines der drei Kationen als unabhängige Variable festgelegt, so liegen die ohne Störung der Eutonie zulässigen Konzentrationen der beiden anderen auf der entsprechenden Abszissenparallele des unabhängig variierten Kations. Wird auch noch die Konzentration des zweiten Salzes willkürlich gewählt, so ist mit dem Schnittpunkt der beiden zugehörigen Parallelen auch die Konzentration des dritten Kations invariabel festgelegt. Von einem einzigen Punkte abgesehen, in welchem das Mischungsverhältnis genau dem „physiologischen Ionengleichgewicht“ entspricht, dem „**Eukrasiepunkt**“, stellt jeder Punkt des Dreiecks ein zwar eutonisches, aber „**dyskrates**“ Gemisch dar, man kann die Punkte also als **Dyskrasiepunkte**, die ganze Fläche als *Dyskrasiedreieck* bezeichnen. Wird das *Mischungsverhältnis* zweier der drei Kationen als unabhängige Variable festgelegt, so liegen die zugehörigen Dyskrasiepunkte auf einer Geraden, welche, von der Ecke zwischen den Nullabszissen der beiden Kationen ausgehend, die gegenüberliegende Seite im Verhältnis des Mischungsquotienten teilt. Linien solcher binären Mischungskonstanz lassen sich also aus A für Na^+/K^+, aus B für K^+/Ca^{++} und aus C für Na^+/Ca^{++} ziehen. Ist als unabhängige Variable dasjenige Mischungsverhältnis zweier Kationen gegeben, welches diese im Eukrasiepunkt besitzen, so liegen die ternären Dyskrasiepunkte auf einer von der entsprechenden Ecke durch den Eukrasiepunkt gezogenen Geraden; auf ihr herrscht dann überall „**binäre** *Eukrasie*“, dyskrat ist nur das Mischungsverhältnis mit dem dritten Kation.

Die Schwierigkeit, die Konzentration der zu studierenden *Ionen selbst* zu bestimmen, wird in der Praxis solcher Dyskrasieversuche von jeher dadurch umgangen, daß man statt ihrer die Konzentrationen ihrer Salze mit dem in der Lösung vorherrschenden Anion zugrunde legt. Das sind also für tierchemische Zwecke beim Studium der Kationen meist die Chloride. Die Vernachlässigung der übrigen, in geringer Menge vertretenen Anionen bedingt dann einen gewissen Fehler, der erforderlichenfalls durch Berücksichtigung des Dissoziationsgrades der Salze verschiedener Anionen korrigiert werden kann. Es verbleibt noch eine weitere, immerhin wohl meist größere Ungenauigkeit, daraus entspringend, daß auch die drei Chloride sich noch durch verschiedenen Dissoziationsgrad untereinander unterscheiden. Auch dieser Fehler muß erforderlichenfalls durch Einstellung der Quotienten aus den Dissoziationsgraden in die Berechnung ausgeglichen werden.

Im allgemeinen findet man aber bisher — wohl stets mit Recht — beide Fehler gering geachtet. Sie erreichen ja auch in der Tat, z. B. beim Studium des ternären $Na^+/K^+/Ca^{++}$-Systems, auch in den extremsten

Fällen im Bereich des ganzen Dyskrasiedreiecks kaum 15 Proz. Bei der folgenden Betrachtung der Anwendungen des Dyskrasienomogramms soll daher dieses vereinfachte Vorgehen der bereits vorliegenden Dyskrasieversuche ohne Korrektur übernommen werden. Setzt man demgemäß an die Stelle der Kationenordinaten Ordinaten der entsprechenden Chloride, so erhöht sich die Eutoniekonstante k auf k', auf welchen Betrag die Seitenlänge bezogen werden muß, und falls man es vorzieht, die Ordinatenwerte statt in Prozenten der eutonischen Gesamtkonzentration (Prozent k') in Zahlen der molaren oder Grammkonzentration (Gramm-Prozent) auszudrücken, so sind an Stelle der Ionenkonzentrationen die Salzkonzentrationen zu setzen, wie das in der Abb. 1 geschehen ist.

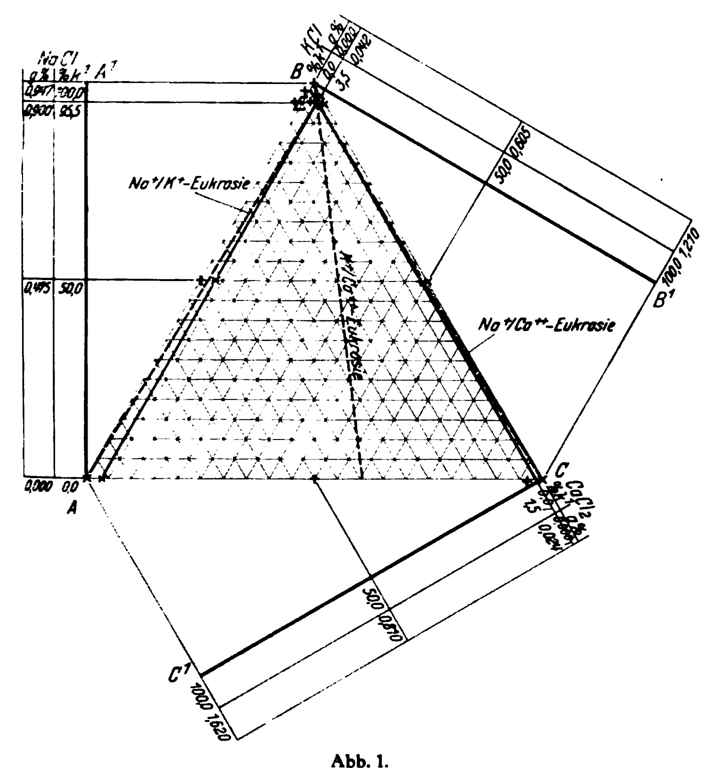


Abb. 1.

Das Dyskrasienomogramm bietet zunächst allerhand Annehmlichkeiten beim *Entwurf von Dyskrasieversuchen.* Will man sie absichtsgemäß mit eutonischen (isosmotischen) Lösungen durchführen, so kann man in einfachster Weise die erforderlichen Mischungen *graphisch* ermitteln, z. B. die Konzentrationen der beiden übrigen Salze ablesen, die zur Ergänzung einer bestimmten gewünschten Konzentration des

Trägers eines dritten Ions nötig sind, und dergleichen mehr. Auc
ermöglicht die Benutzung eines Dyskrasienomogramms, genauer als die
wohl sonst geschehen würde den Bereich des ganzen Dyskrasiefelde
auszusuchen, in dem Bestimmungen erwünscht sind. Dabei wird di
graphische Grundlage auf einen wichtigen Umstand besonders nach-
drücklich aufmerksam machen: Der Eukrasiepunkt einer jeden de

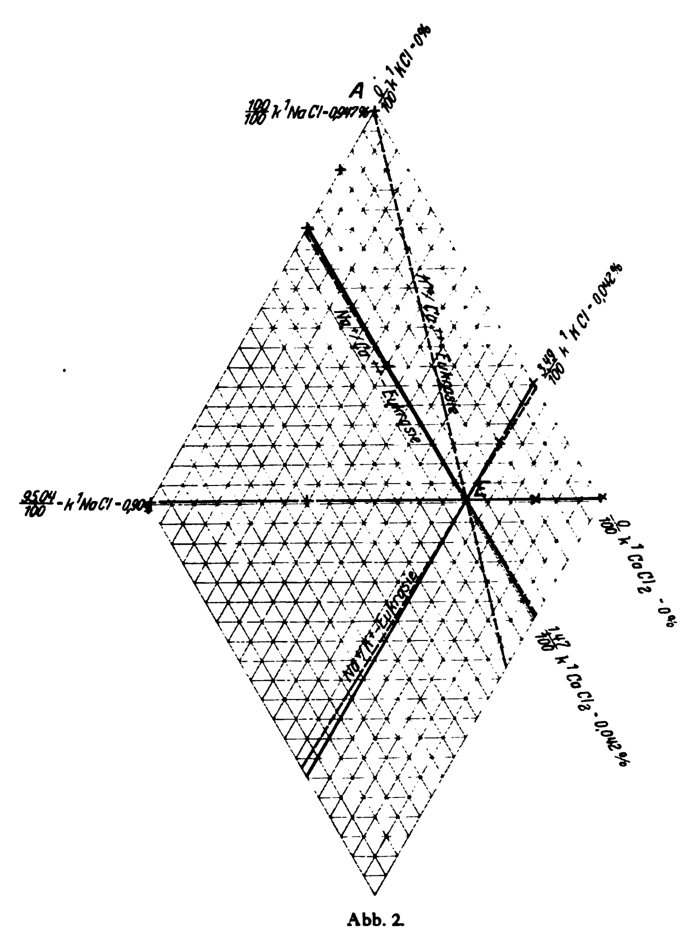


Abb. 2.

vielen Drei-Ionenkombinationen liegt mehr oder weniger stark außer-
halb des Schwerpunkts des Dyskrasiedreiecks. Das mag angesichts
der Wahl des Ordinatenmaßstabs selbstverständlich erscheinen, ist
aber bei dem Fehlen eines solchen Veranschaulichungsmittels doch
von zahlreichen Experimentatoren vernachlässigt worden, welche in
ihren Dyskrasieversuchen stets die gleichen Multipla oder Bruchteile
der eukraten Einzelkonzentration benutzt haben (also z. B. immer

ganz gleichmäßig sowohl von Na^+ wie von K^+ oder Ca^{++} $^1/_2$, $^1/_{10}$ oder dergleichen von deren physiologischer Konzentration zum Vergleich herangezogen). Bleibt mit Hilfe des Nomogramms die starke Asymmetrie des Eukrasiepunktes bewußt, so wird man dann auch im Auge behalten, daß statt jener für alle drei Systemgenossen gleichmäßigen Variationen mitunter besser solche gewählt würden, die einen engeren Bereich des ganzen Feldes, und zwar z. B. in der näheren Umgebung des Eukrasiepunktes erfassen, wozu dann zweckmäßig ein vergrößerter Ausschnitt des Nomogramms die Anhaltspunkte liefert. Einen solchen Ausschnitt bildet z. B. — wenn, wie bisher, die Anwendung auf ein $Na^+/K^+/Ca^{++}$-System zugrunde gelegt wird — der in Abb. 2 dargestellte Rhombus aus der oberen Ecke der Abb. 1. In einem derartigen Ausschnitt nimmt der Eukrasiepunkt eine symmetrischere Lage ein; die zu prüfenden Dyskrasiepunkte können nach allen Seiten hin gleichmäßig ausgesucht werden, um die Rolle geringfügiger Abweichungen von der Eukrasie eingehender zu studieren.

Ein zweites Anwendungsgebiet solcher Nomogramme ist die übersichtliche *Darstellung der Ergebnisse von Dyskrasieversuchen.* Im allgemeinen ist ihr Gegenstand das Studium einzelner Partialfunktionen, der Dyskrasieeffekt also dann entweder Steigerung oder Depression, Erregung oder Lähmung, Plus oder Minus gegenüber dem Verhalten im eukraten Gemisch, so z. B. an den meist zum Studium gewählten Objekten ausgeschnitten überlebender muskulärer oder nervöser Apparate (isoliertes Herz, Darm, Uterus, Gefäßpräparat, Nerv usw.) Erhöhung oder Verminderung von Tonus, Rythmus, Reizschwelle usw., und entsprechend an isolierten Zellen Mehrung oder Minderung von Atmung, Gärung, Protoplasmabewegung, Teilung, Phagozytose usf. Es genügt in solchen Fällen die Eintragung eines „+" oder „—" (oder besser, um die Erkennung des zugehörigen Punktes des Feldes nicht zu erschweren, eines „+" bzw. „×", erforderlichenfalls unter Zahlenangabe der absoluten oder relativen Ausschlagsgröße) an dem betreffenden Dyskrasiepunkt, um den schnellen Überblick über eine beliebig große Zahl von Einzelergebnissen *auf einem Blatt* zu ermöglichen, die sonst nur in seitenlangen Aufzählungen berichtet werden können.

Es sei erlaubt, die Anwendung des Nomogramms an einem konkreten Beispiel zu zeigen. Als solches seien die Ergebnisse der unseres Wissens bisher am mühevollsten angelegten und am sorgfältigsten durchgeführten derartigen Dyskrasieprüfung gewählt, des Studiums der $Na^+/K^+/Ca^{++}$-Dyskrasie am ausgeschnitten überlebenden Meerschweinchenuterus durch *Kochmann* und *Holub*[1]). Von den dort untersuchten Einzelfunktionen

[1]) Für die freundliche Überlassung des Zahlenmaterials und die Erlaubnis zur Benutzung der im Erscheinen (in dieser Zeitschr.) befindlichen Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. *Kochmann*-Halle zu Dank verpflichtet.

genügt es, hier eine einzelne herauszugreifen, und so sind sowohl in Abb. 1 wie in Abb. 2 die von den Verfassern festgestellten Dyskrasiewirkungen auf den *Tonus des Uterus* (+ = Erhöhung, × = Herabsetzung) am jeweiligen Dyskrasiepunkte eingetragen. Man halte dieser Art der Wiedergabe gegenüber, daß die Darstellung der Versuchsergebnisse in Worten, wie sie z. B. in der Erstveröffentlichung dieser Untersuchungen[1]) notwendig war, mehr als eine Seite beanspruchte, dabei bewußte und unbewußte Wiederholungen enthielt und eine Ordnung der Ergebnisse für den Leser oder durch den Leser sehr schwer machte. Unsere graphische Darstellung gibt demgegenüber sogar Einblicke in Zusammenhänge, welche sonst unter Umständen überhaupt nicht vor Augen treten können; so drängt sich z. B. angesichts des in dem Diagramm der Abb. 1 verarbeiteten Versuchszahlenmaterials eine mögliche Erklärung für die sonst sehr auffällige Erscheinung auf, daß an einzelnen Stellen des Feldes Tonussteigerungen und -senkungen so nahe beieinander zu liegen kommen, also auch in entfernt vom Eukrasiepunkt liegenden Gegenden des Feldes bereits durch sehr kleine Mischungsunterschiede zustandekommen. Die graphische Darstellung läßt daran denken, daß hier die binären Eukrasielinien eine entscheidende Rolle spielen, denn in der Tat sind vielfach solche Dyskrasiepunkte entgegengesetzten Ausschlags trotz ihrer räumlichen Nähe gerade durch eine solche Eukrasielinie voneinander getrennt[2]).

Weitere Anwendungen derartiger Dyskrasienomogramme liegen in der Möglichkeit, mit ihrer Hilfe Analysenresultate unter dem Gesichtspunkt der Dyskrasiefrage nebeneinander zu stellen, so z. B. Aschenanalysen verschiedener Nahrungsmittel, Ionenanalysen der Heilquellen und anderes mehr. Wenn die Notwendigkeit der Beschränkung auf ternäre Ausschnitte der gesamten Ionenmischung als Nachteil erscheinen sollte, so mag zu allem Überfluß hervorgehoben werden, daß ebensogut statt eines $Na^+/K^+/Ca^{++}$-Systems auch ein $K^+/Ca^{++}/Mg^{++}$-, ein Chlorid-Phosphat / Carbonat-, erforderlichenfalls auch ein $Ca^{++}/Mg^{++}/H^+$-System usw. zur Darstellung kommen kann, auch zwei — oder unter Umständen sogar noch mehr — solcher Systeme gleichzeitig vorgeführt werden können, indem einer oder mehreren der Ordinatenachsen doppelte Werte (z. B. gleichzeitig für Ca^{++} und Mg^{++}) im gleichen Nomogramm verliehen werden[3]).

Eine große Erleichterung der Verarbeitung alles in solchen Diagrammen Darstellbaren liegt, darauf sei schließlich noch hingewiesen, in der Unterteilung des Gesamtfeldes durch die verschiedenen, sich jeweils von selbst ergebenden Teilungslinien. So zerfällt — um zum Ausgangsbeispiel zurückzukehren — das Dyskrasiefeld des $Na^+/K^+/Ca^{++}$-

---

[1]) Dissertationsauszug *Holub*. Halle 1924.

[2]) Nach inzwischen mir freundlichst zur Kenntnis gegebenen noch eingehenderen Ermittlungen Prof. *Kochmanns* erscheinen die Beziehungen freilich noch verwickelter.

[3]) Dies ist z. B. in der Darstellung einer Anwendung auf balneologische Fragen geschehen, die demnächst a. a. O. (Arch. f. Balneol.) erscheinen wird.

Systems der Säuger-Ringerlösung durch die drei „monären“ Eukrasieparallelen zur jeweiligen Nullabszisse in je zwei Felder *absolut* „hypokrater“ bzw. „hyperkrater“[1]) Konzentration des betreffenden Ions, ferner entsteht jeweils diesseits bzw. jenseits jeder binären Eukrasielinie je ein Feld *relativer* Hyperkratie des einen oder anderen der zwei zugehörigen Ionen. Alles das fördert noch die schnelle Übersicht und Beurteilung.

[1]) Beide Bezeichnungen ergeben sich in Analogie zu „hypotonisch“ bzw. „hypertonisch“.

Über die Rolle der Niere bei dem Abbau der β-Oxybuttersäure.

Von

I. Snapper, A. Grünbaum und J. Neuberg.

(Aus dem Laboratorium für allgemeine Pathologie der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 19. Oktober 1925.)

In früheren Untersuchungen haben wir nachgewiesen, daß die Niere imstande ist, die Ketten der aromatischen Fettsäuren zu verkürzen durch eine Oxydation der β-CH_2-Gruppe[1]). Es ist bekannt, daß die aromatischen Fettsäuren schwer oxydable Substanzen sind. Um so auffälliger ist es, daß eben die Nieren diese β-Oxydation zustande bringen können. Hierdurch ist nachgewiesen, daß die Nieren Organe sind, welche bei der β-Oxydation im allgemeinen eine sehr wichtige Rolle spielen. In diesem Gedanken weitergehend, haben wir untersucht, ob die Niere auch andere Verbindungen in β-Stellung oxydieren kann. Hauptsächlich haben wir den Einfluß der Niere auf den Abbau der β-Oxybuttersäure studiert.

Es ist allgemein bekannt, daß die β-Oxybuttersäure in der Leber entsteht. Sie ist ein Produkt der β-Oxydation der Fettsäuren und der Aminosäuren im allgemeinen, der Buttersäure im besonderen. Es ist aber deutlich, daß die β-Oxybuttersäure ein Derivat der Buttersäure ist, das nur teilweise in der β-CH_2-Gruppe oxydiert ist, daß also die β-Oxydation der Buttersäure in der Leber nur unvollständig stattfindet.

Wo wird die β-Oxybuttersäure weiter abgebaut? Schon 1906 haben *Embden*[2]) und seine Mitarbeiter beschrieben, daß, wenn man die normale Leber mit Blut, dem β-Oxybuttersäure zugesetzt ist, durchströmt, große Mengen Diacetsäure nachzuweisen sind. Wird nun die β-Oxybuttersäure von der Leber nur zu Diacetsäure oxydiert oder wird ein Teil der β-Oxybuttersäure in der Leber weiter abgebaut, so daß die Abbauprodukte nicht mehr nachzuweisen sind? Insoweit uns bekannt,

---

[1]) *Snapper* und *Grünbaum*, diese Zeitschr. **150**, 12, 1924.
[2]) *Embden*, *Salomon* und *Schmidt*, Hofmeisters Beitr. **8**, 129, 1906.

ist eine sichere Antwort auf diese letzte Frage nicht gegeben. Wir haben untersucht, ob die *Niere* eventuell auf den Abbau der β-Oxybuttersäure Einfluß ausüben könnte. Ausgehend von der genannten Tatsache, daß die Niere zu kräftiger β-Oxydation imstande ist, haben wir gemeint, daß die weitere β-Oxydation der β-Oxybuttersäure in der Niere stattfinden könnte.

Wir haben deshalb die Niere mit Blut durchströmt, zu dem β-Oxybuttersäure zugesetzt war, und haben untersucht, ob und wie die β-Oxybuttersäure während der Durchströmung verschwindet, und weiter, ob die β-Oxybuttersäure in Diacetsäure bzw. Aceton umgesetzt wird.

Die Methodik der β-Oxybuttersäurebestimmung in Organen und in Blut, das durch Organe geströmt ist, muß in vielen Hinsichten als schwierig betrachtet werden. Für die quantitative Bestimmung der β-Oxybuttersäure muß diese Substanz mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat nach *Shaffer* oxydiert werden: es entsteht Diacetsäure bzw. Aceton, und dieses Aceton wird mittels Jodtitration oder durch irgend eine andere Methode quantitativ bestimmt. Sobald in den Organen Glykogen oder Milchsäure enthalten ist, besteht die Möglichkeit der Umsetzung des Glykogens zu Kohlehydraten und Oxydation der Kohlehydrate zu jodbindenden Substanzen. Auch die anwesende Milchsäure wird oxydiert, und zwar zu Acetaldehyd, einer Substanz, die stark jodbindende Eigenschaften hat und eventuell auch die anderen quantitativen Bestimmungen des Acetons beeinflußt[1]). Sobald man also glykogenhaltige Organe durchströmt, muß man für die Bestimmung der β-Oxybuttersäure erst die Kohlehydrate entfernen und erst dann oxydieren. Nach der Oxydation der β-Oxybuttersäure zu Diacetsäure bzw. Aceton müssen dann die anderen jodbindenden Substanzen vernichtet werden, bevor man zur Acetonbestimmung übergeht. Das Vernichten des Acetaldehyds und der anderen jodbindenden Substanzen und nachherige Bestimmung der kleinen Mengen Acetons hat uns sehr oft Schwierigkeiten gebracht, auch wenn wir die verschiedenen hierfür bekannten Methoden und Modifikationen der Methoden gebraucht haben.

Bei der Niere hat man aber viel weniger Schwierigkeiten. Die Niere ist ein Organ, das kein Glykogen enthält[2]), und in der auch die Menge Milchsäure offenbar nicht übermäßig groß ist. Für die Bestimmung der β-Oxybuttersäure in der Durchströmungsflüssigkeit und in der Nierensubstanz haben wir deshalb die Methode von *van Slyke* ohne Modifikationen benutzen können.

[1]) *Engfeldt*, Beitr. z. Kenntn. d. Acetonkörper. Lund 1920.
[2]) *Nishi*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 62.

Unsere β-Oxybuttersäurebestimmungen sind genau nach d Originalvorschriften von *van Slyke*[1]) ausgeführt. Nur haben wir d Lösungen nach Zusatz von $HgSO_4$ zur Enteiweißung immer läng als eine Viertelstunde stehengelassen, damit die Fällung vol ständiger wird. Das Trocknen der Tiegel bei 110° muß nach unsere Erfahrungen meistens länger als 1 Stunde dauern, um Gewichtskonstan zu erreichen. Die Abkühlung der Tiegel vor dem Abwiegen geschieh in einem Schwefelsäureexsikkator. Die analytische Wage muß natürlic frei von Feuchtigkeit sein, weil sonst die Tiegel während des Abwiegen schnell an Gewicht zunehmen. Um gute Resultate zu erhalten, muß der β-Oxybuttersäuregehalt der zu untersuchenden Lösung im all gemeinen wenigstens 1,5 mg betragen, damit beim Kochen mit dem *Dénigès*-Reagens eine Fällung von mehr als 10 mg entsteht. Unterhalb dieses Wertes ist die Methode nicht mehr ganz genau.

Die Genauigkeit der Methode von *van Slyke* für die β-Oxybuttersäurebestimmung im Blute und Nierenbrei ergibt sich aus folgenden Beispielen von langen Reihen blinder Versuche.

3,33 mg β-Oxybuttersäure in wässeriger Lösung gibt eine Fällung von 28,9 mg. Hieraus berechnet man (multiplizieren mit 0,1183) den Gehalt der Lösung als 3,40 mg.

5 mg β-Oxybuttersäure in Wasser gelöst, geben eine Fällung von 42,7 mg. Der Gehalt hieraus berechnet, wird 5,05 mg.

Auch zu Blut zugesetzte β-Oxybuttersäure kann quantitativ nachgewiesen werden. 5 ccm einer wässerigen β-Oxybuttersäurelösung gaben eine Fällung von 25 bzw. 24,5 mg. Dieselbe Menge β-Oxybuttersäure, in Blut gelöst, gab pro 5 ccm Blut eine Fällung von 25,0 bzw. 25,0 mg.

Normaler Nierenbrei gab in vielen wiederholten Versuchen nie eine Fällung bei der Methode von *van Slyke*. Der β-Oxybuttersäuregehalt der normalen Niere muß also als minimal betrachtet werden. Zugesetzte β-Oxybuttersäure läßt sich quantitativ zurückfinden.

30 ccm einer wässerigen β-Oxybuttersäurelösung gaben nach *van Slyke* eine Fällung von 16,1 mg.

5 g Nierenbrei plus 30 ccm derselben Lösung gaben eine Fällung von 17,0 mg.

5 g Nierenbrei plus 45 ccm derselben Lösung gaben eine Fällung von 25,9 mg.

Aus den blinden Analysen ergab sich also, daß wir für die β-Oxybuttersäurebestimmungen bei den Nierendurchströmungen die Methode von *van Slyke* ohne Modifikationen anwenden konnten.

---

[1]) *van Slyke* und *Fitz*, Journ. of biol. Chem. 32, 17; siehe auch *Schmitz* in Abderhaldens Physiol. Arbeitsmethoden.

Wir machen nochmals ausdrücklich darauf aufmerksam, daß diese Originalmethode von *van Slyke* nur für Nierenbrei benutzt werden kann, weil kein Glykogen in den Nieren anwesend ist und *kleine* Mengen Acetaldehyd, aus Milchsäure bei der Oxydation entstanden, die Bestimmung nach *van Slyke* nicht stören, bei den Jodtitrationen dagegen großen Einfluß haben. Für β-Oxybuttersäurebestimmungen in Leber und Muskeln muß eine ganz andere Methode gebraucht werden.

Die Durchströmungen der Niere[1]) mit Blut, dem β-Oxybuttersäure[2]) zugesetzt war, gaben eindeutige Resultate.

1. *Schafsniere*, durchströmt mit 1200 ccm Schafsblut, zu dem **710 mg** β-Oxybuttersäure zugesetzt waren.

Dauer der Durchströmung 2½ Stunden: das Blut wurde in der Zeit mehr als 13mal durch die Niere geführt.

Während der Durchströmung wurde, wie in allen folgenden Versuchen, die Ureterflüssigkeit immer wieder zum Blute zugesetzt.

Vor der Durchströmung war das Gewicht der Niere 74 g, nach der Durchströmung 133 g.

Nach der Durchströmung war in der Niere keine β-Oxybuttersäure nachzuweisen.

Der β-Oxybuttersäuregehalt des Blutes nach der Durchströmung war *258 mg*.

Bei der Durchströmung sind also 452 mg β-Oxybuttersäure oder **63 Proz.** der zugesetzten Menge verschwunden.

2. *Schweinsniere*, durchströmt mit 1000 ccm Schweineblut, zu dem *435 mg* β-Oxybuttersäure zugesetzt waren.

Dauer der Durchströmung 2 Stunden. Das Blut wurde 20mal durch die Niere geführt.

Gewicht der Niere nach Durchströmung 337 g.

Nach der Durchströmung in der Niere nur Spuren β-Oxybuttersäure.

β-Oxybuttersäuregehalt des Blutes nach Durchströmung *130 mg*.

Bei der Durchströmung sind also **305 mg** β-Oxybuttersäure, d. h. 70 Proz. der zugesetzten Menge verschwunden.

3. ***Hundeniere***, durchströmt mit 650 ccm Hundeblut, zu dem *390 mg* β-Oxybuttersäure zugesetzt waren.

Dauer der Durchströmung 2 Stunden. Das Blut wurde achtmal durch die Niere geführt.

Gewicht der Niere nach der Durchströmung 70 g.

Nach der Durchströmung in der Niere *30 mg*, im Blute *200 mg* β-Oxybuttersäure.

---

[1]) Die Durchströmungen wurden angestellt im Physiol. Institut (Dir. Prof. *van Rynberk*) mit dem *Embden*schen Apparat.

[2]) Das Präparat wurde aus Diabetiker-Harn dargestellt.

Bei der Durchströmung sind also **160 mg** β-Oxybuttersäure, d. h. **41 Proz.** der zugesetzten Menge verschwunden.

4. *Kalbsniere,* durchströmt mit 1200 ccm Kalbsblut, zu dem *610 mg* β-Oxybuttersäure zugesetzt waren.

Dauer der Durchströmung 1¼ Stunden. Das Blut wurde 13mal durch die Niere geführt.

Gewicht der Niere nach der Durchströmung 532 g.

Nach der Durchströmung in der Niere *117 mg,* im Blute *236 mg* β-Oxybuttersäure.

Bei der Durchströmung sind also **257 mg** β-Oxybuttersäure, d. h. **42 Proz.** der zugesetzten Menge verschwunden.

5. *Kalbsniere,* durchströmt mit 1200 ccm Kalbsblut, zu dem *710 mg* β-Oxybuttersäure zugesetzt waren.

Dauer der Durchströmung 1 Stunde. Das Blut wurde fünfmal durch die Niere geführt.

Gewicht der Niere nach der Durchströmung 430 g.

Nach der Durchströmung in der Niere *138 mg,* im Blute *360 mg* β-Oxybuttersäure.

Bei der Durchströmung sind also **212 mg** β-Oxybuttersäure, d. h. **30 Proz.** der zugesetzten Menge verschwunden.

6. *Menschenniere,* durchströmt mit 880 ccm Menschenblut, zu dem *449 mg* β-Oxybuttersäure zugesetzt waren.

Dauer der Durchströmung 1 Stunde 40 Minuten. Das Blut wurde zehnmal durch die Niere geführt.

Gewicht der Niere nach der Durchströmung 172 g.

Nach der Durchströmung in der Niere *49 mg,* im Blute *270 mg* β-Oxybuttersäure.

Bei der Durchströmung sind also **130 mg** β-Oxybuttersäure, d. h. **29 Proz.** der zugesetzten Menge verschwunden.

In keinem einzigen Durchströmungsversuch durch die Niere konnte mit der van Slykeschen Methode im Blute Aceton oder Diacetsäure nachgewiesen werden.

Das Resultat ist also unzweideutig: Im Durchströmungsversuch sind die Nieren imstande, beträchtliche Mengen β-Oxybuttersäure abzubauen. Daß man es hier mit einer Funktion der lebendigen Nierenzellen zu tun hat, ergibt sich aus der Tatsache, daß beim Mißlingen der Durchströmung oder zu langsamer Durchströmung kein Abbau der β-Oxybuttersäure nachzuweisen war.

Der Einfluß der Niere auf die β-Oxybuttersäure unterscheidet sich in vieler Hinsicht von dem Einfluß, welchen die Leber auf die β-Oxybuttersäure ausübt. Wenn man die normale Leber mit β-Oxybuttersäure durchströmt, entstehen große Mengen Diacetsäure bzw.

Aceton. Hiervon sieht man bei der Nierendurchströmung nichts, die Niere baut die β-Oxybuttersäure ab, aber nicht oder nur spurweise über Diacetsäure, denn bei unseren Durchströmungen haben wir mit der *van Slyke*schen Methode nie Diacetsäure isolieren können: der Abbau der β-Oxybuttersäure geht offenbar in der Niere einen ganz anderen Weg als in der Leber.

Hieraus sieht man, daß, wenn auch sowohl die Leber als die Niere zu einer kräftigen β-Oxydation imstande sind, dennoch diese β-Oxydationsprozesse in den beiden Organen fundamental verschieden sind. Die β-Oxydation der Leber zeigt sich in der β-Oxydation der langen Fettsäureketten mit einer geraden Anzahl der C-Atome, so daß Buttersäure entsteht, welche die Leber wieder durch β-Oxydation zu β-Oxybuttersäure umsetzt. Die Niere zeigt ihre Oxydationseigenschaften in der β-Oxydation der aromatischen Fettsäuren. Weiter haben beide Organe einen Einfluß auf die β-Oxybuttersäure. Die Leber oxydiert die β-Oxybuttersäure zu Diacetsäure, die Nieren bauen sie zu unbekannten Produkten ab.

Offenbar ist also die β-Oxydation in der Leber auf andere Substanzen eingestellt bzw. folgt anderen Bahnen, als die β-Oxydation in der Niere.

Den prinzipiellen Unterschied zwischen der β-Oxydation in der Leber und in den Nieren ergibt sich auch aus den folgenden Versuchen. Wenn man die Leber mit Buttersäure durchströmt, entstehen große Mengen Diacetsäure bzw. β-Oxybuttersäure. Wenn man die Niere mit Buttersäure durchströmt, kann man nach *van Slyke* keine Diacetsäure oder β-Oxybuttersäure nachweisen, wie sich aus folgenden Protokollen ergibt.

1. Kalbsniere, durchströmt mit 1000 ccm Kalbsblut, zu dem 2,2 g buttersauren Natriums zugesetzt waren.

Dauer der Durchströmung 1 Stunde 35 Minuten. Das Blut wurde 25mal durch die Niere geführt.

Nach der Durchströmung sind weder Aceton, Diacetsäure oder β-Oxybuttersäure im Durchströmungsblut oder in der Niere nachzuweisen.

2. Kalbsniere, durchströmt mit 1000 ccm Kalbsblut, zu dem 2,5 g buttersauren Natriums zugesetzt waren.

Dauer der Durchströmung 1½ Stunden. Das Blut wurde 15mal durch die Niere geführt.

Nach der Durchströmung sind weder Aceton, Diacetsäure oder β-Oxybuttersäure im Durchströmungsblut oder in der Niere nachzuweisen.

Aus der Buttersäure entsteht also bei der Nierendurchströmung keine β-Oxybuttersäure. Sowohl die Niere als die Leber sind zu β-Oxy-

dation imstande, die β-Oxydation der Leber greift aber ganz andere Substanzen an und verläuft nach ganz anderen Prinzipien als die β-Oxydation in der Niere.

Ist dieser Abbau der β-Oxybuttersäure in der Niere vielleicht ein unspezifischer Prozeß, der in allen Organen stattfindet, oder ist dieser Abbau nur an die Niere gebunden?

Es steht für uns fest, daß im gesunden Organismus andere Organe als die Niere die Hauptmenge der im Stoffwechsel gebildeten β-Oxybuttersäure abbauen. Dennoch wissen wir, daß nicht *alle* Organe zu diesem Abbau imstande sind. Wir können z. B. die Angabe *Schmitz*[1]) bestätigen, der angegeben hat, daß die Lunge *nicht* imstande ist, die β-Oxybuttersäure weiter zu oxydieren.

Am 19. Oktober 1923 hat Fräulein Dr. *Sluiter* für uns eine Katzenlunge nach der von ihr ausgearbeiteten Methode[2]) mit 450 ccm Kalbsblut durchströmt, zu dem so viel β-Oxybuttersäure zugesetzt war, daß die Konzentration 1,2 Prom. betrug.

Dauer der Durchströmung 1½ Stunden. In dieser Zeit war das Blut 16mal durch die Lunge geführt.

Nach der Durchströmung war der β-Oxybuttersäuregehalt des Blutes noch 1,19 Prom.: weder Aceton noch Diacetsäure konnten nachgewiesen werden.

Die Lunge hatte also bei der Durchströmung keine β-Oxybuttersäure abgebaut.

Zusammenfassung.

1. Die Niere ist, ebenso wie andere Organe, imstande, beträchtliche Mengen β-Oxybuttersäure abzubauen.

2. Dieser Abbau der β-Oxybuttersäure in der Niere geht nicht über Diacetsäure, im Gegensatz zu dem, was man bei der Durchströmung der Leber sieht.

3. Oxydation von Buttersäure zu β-Oxybuttersäure findet *nicht* in der Niere statt. Die β-Oxydation in der Niere ist also fundamental verschieden von der β-Oxydation in der Leber.

4. Die Lunge hat keinen Einfluß auf den Abbau der β-Oxybuttersäure.

---

[1]) *Schmitz*, diese Zeitschr. **160**, 20, 1925.

[2]) *E. Sluiter*, Arch. néerl. de Phys. **9**, 461, 1924.

Zur Urobilinogenurie.

Von

K. Hoesch, Erlangen.

(Eingegangen am 19. Oktober 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Feststellung der Identität des Hämatoidins mit Bilirubin durch *H. Fischer*[1]) und die experimentellen Untersuchungen von *Mac Mann*[2]), der bei Hunden nach Leberexstirpation schwersten Ikterus zustande kommen sah, haben einwandfrei den Beweis für die Möglichkeit extrahepatischer Bilirubinbildung erbracht. Damit in Zusammenhang steht auf jeden Fall auch die Frage der Urobilinbildung, des Urobilinstoffwechsels und des Zustandekommens der Urobilinurie, da sich Urobilin nur aus Bilirubin bilden kann. Die enterogene Urobilinentstehung, die zentrale Stellung der Leber in der Frage des Urobilinumsatzes ist wohl über jeden Zweifel erhaben. Ebenso gilt auch die extraenterale Urobilinbildung, soweit sie vom Darm aus durch Bakterieneinwirkung in die Gallenwege übergeht, als gesichert. *Tsuchiga*[3]), *Fischler*[4]) und die französischen Autoren [*Hayem*, *Brulé*, *Tissier*[5])] sind dafür eingetreten, daß eine extraintestinale Urobilinbildung möglich ist. *Fischler*[6]) glaubte an seinen Gallenfisteltieren experimentell den Beweis erbracht zu haben, daß Urobilin in der Leber gebildet werden könne, obwohl es ihm seinerzeit nicht gelang, den Darm der Tiere urobilinogenfrei zu bekommen, und obwohl bei allen Versuchen nicht durchweg das gleiche Resultat vorlag. Neuerdings glaubte dann *Fischler*[7]) eine wesentliche Stütze für diese Theorie in der Urobilinurie

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1923.
[2]) Kongr.-Zentralbl. 1924.
[3]) Zeitschr. f. exper. Pathol. 7, 352.
[4]) Physiologie und Pathologie der Leber (Verlag Springer).
[5]) Vgl. *Meyer-Betz*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderh. 1913.
[6]) l. c.
[7]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1925 und Vortrag im ärztl. Verein München 1924.

bei glykopriver Intoxikation bei Tieren festgestellt zu haben, obwohl dieses Zustandekommen der Urobilinurie zwanglos durch eine Leberzellenschädigung und extraenterale Urobilinbildung in den Gallenwegen möglich sein könnte, ganz abgesehen davon, daß beim Hunde trotz des unterbundenen Choledochus Bilirubin sich reichlich im Darminhalt findet [*Gerhardt*[1])].

Es ergibt sich die wesentliche Frage: Reicht in der Tat die enterogene Theorie der Urobilinentstehung nicht mehr aus für die Erklärung der Urobilinurie bei Leberschädigung und bei Blutschädigung. Worin sind die Hauptschwierigkeiten dieses Problems begründet, wodurch sind die zahlreichen, einander widersprechenden Resultate der einzelnen Autoren, die sich mit dieser Frage beschäftigen, zu erklären; so wurde festgestellt, daß Urobilinurie und Bilirubinämie weitgehend unabhängig voneinander bestehen [*Feigl* und *Querner*[2])], im Gegensatz dazu fanden *Falta*[3]), *Felsenreich* und *Satke*[4]) die Bilirubinämie erhöht, wenn die Urobilinurie gesteigert war. Im Ascites durch Pfortaderstauung wird Urobilinogen-Urobilin bald beobachtet, bald vermißt. Pathologische Urobilinogenurie und Urobilinmenge im Stuhl gehen nicht parallel, wenn nicht ein gleichbleibender Grad von Leberzellschädigung dabei vorhanden ist. *Jakobs* und *Scheffer*[5]) zeigen in einer neuen Arbeit, daß selbst bei experimentellen Hämolysen eine die Norm oft nur wenig übersteigende Urobilinurie beobachtet wird, ein auffallender Befund, wenn man bedenkt, daß die Leber einerseits beim Normalen täglich geringe Urobilinmengen in den großen Kreislauf übertreten läßt, andererseits bei diesem Experiment den gewaltigen Urobilinstrom vom Darm her völlig bewältigen soll. Einander widersprechende Resultate ergeben schon beim Normalen quantitative Bestimmungen des Gesamturobilins im Stuhl.

Wir glauben, daß zunächst folgende Schwierigkeiten überwunden werden müßten:

1. Es fehlt noch eine brauchbare Methode, Urobilinogen *im Blute* nachzuweisen; einzelne, wie die von *Hildebrandt*[6]) empfohlene, sind völlig unzuverlässig. Gerade der Nachweis von Urobilinogen im Serum neben Bilirubin wäre besonders wichtig. Wir sind eben mit verschiedenen Methoden beschäftigt, und es fiel dabei auf, wie häufig ein genauer Nachweis im Serum bei starker Urobilinogenurie mißlingt, auch wenn eine Absorption an das Eiweißpräzipitat nicht vorlag.

---

[1]) Vgl. *Meyer-Betz*.
[2]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **140**, 321.
[3]) Münch. med. Wochenschr. 1921.
[4]) A. f. Verdauungskrankh. 1924.
[5]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **44**.
[6]) *Hildebrandt*, Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 49.

2. Es muß eine Isolierung des Urobilinogens bzw. Urobilins *im Harn* gefordert werden. Nachdem Urobilin ein wenigstens in seiner Konstitution völlig unbekannter Körper ist, kommt nur das Urobilinogen in Betracht, das chemisch genau bekannt ist; es gibt mit *Ehrlichs* Reagens einen roten Farbstoff, der sich aus dem Harn mit Chloroform leicht isolieren und dann mit Äther fällen läßt, dessen Kristallisation bis jetzt noch nicht gelang, aber von größter Bedeutung wäre, da das *Ehrlich*sche Reagens (ähnlich wie das von *Schlesinger* auf Urobilin) ein Gruppenreagens für eine große Anzahl von Blut- und Gallenfarbstoffderivaten für Tryptophan, selbst für einige Oxybenzole usw ist.

Ferner käme in Betracht die Isolierung des Mesobilirubinogens (= Urobilinogen) als Salz oder die eines Oxydationsproduktes.

Es ist vielleicht am Platze, die Körper, die sich vom Mesobilirubinogen ableiten, kurz zu besprechen, da die Verhältnisse etwas kompliziert sind und vielfach mißverstanden werden, so schreibt z. B. *Hammarsten*[1]) von einem Harnurobilinogen und von einem anderen mit Mesobilirubinogen identischen Harnurobilinogen, das sich wieder anders verhält. *H. Fischer*[2]) hat in der Arbeit mit *Meyer-Betz* den Beweis geliefert, daß Mesobilirubinogen mit Urobilinogen identisch ist durch Isolierung des Urobilinogens aus dem pathologischen Harne, er hat eine acide und eine nicht acide Form unterschieden[3]); es ist anzunehmen, daß dieses mit dem in den Fäces enthaltenen Urobilinogen (Sterkobilirubinogen) identisch ist [wegen gleicher Reaktionen, und besonders wegen der Überführbarkeit in Mesobiliviolin[4])].

Fischer[4]) hat weiter angegeben, daß Mesobilirubinogen durch Oxydation sich in den kristallisierten Farbstoff Mesobilirubin überführen läßt, der keine Urobilineigenschaften hat, und daß das isolierte Mesobilirubinogen ebenso wie das Urobilinogen im Harne durch „Luftoxydation" bei der spontanen Zersetzung in Urobilin übergeht.

Urobilin ist nach *Fischer*[4]) gleichbedeutend mit Pyrrolschmiere; es ist zu den Farbstoffen vom Dipyrrylmethentypus zu rechnen, Farbstoffe mit Urobilineigenschaften, die *Fischer* und Mitarbeiter[4]) durch Synthese dargestellt haben.

Fischer[4]) hat diese Körper auf einer übersichtlichen Tafel zusammengestellt.

Mesobilirubinogen { $\underset{}{\overset{\text{oxyd.}}{\rightleftarrows}}$ Mesobilirubin
Mesobilirubinogen { $\rightarrow$ Mesobiliviolin $\underset{\text{oxyd.}}{\overset{\text{red.}}{\rightleftarrows}}$ Mesobiliviolinogen $\downarrow$ Urobilin
Mesobilirubinogen { $\rightarrow$ Urobilin

Hier ist noch ein dritter Farbstoff, Mesobiliviolin, erwähnt, den *Fischer*[4]) durch Einwirkung von Eisenchloridsalzsäure auf Mesobilirubinogen erhalten hat. Dieser Farbstoff hat vielleicht für die Klinik noch besondere Bedeutung. Er ist leicht festzustellen, da er durch drei Absorptionsstreifen

[1]) *Hammarsten*, Lehrb. d. phys. Chem.
[2]) Zeitschr. f. Biologie 1915.
[3]) Ebendaselbst 1911 (III. Mitteilung).
[4]) Hoppe-Seylers Zeitschr. 187,/188.

charakterisiert ist. Es ist mir aufgefallen, daß manche Urobilinogenharne nach Behandlung mit Eisenchloridsalzsäure im Chloroformextrakt diese drei Streifen aufweisen, andere Urobilinogenharne wieder nicht. Eine Verwechslung mit einem Oxydationsprodukt des Bilirubins (Choletelin usw.) oder mit Porphyrin konnte ausgeschlossen werden. Dieses eigenartige Verhalten des Urobilinogenharns bedarf noch weiterer klinischer Untersuchungen. Zur Förderung der Urobilinfrage, insbesondere der Isolierung und quantitativen Bestimmung scheinen mir einige folgende Beobachtungen und Betrachtungen von Wert zu sein.

Umwandlung des Urobilinogens in Urobilin.

Im folgenden habe ich geprüft, unter welchen Umständen sich das Urobilinogen im pathologischen Harn in Urobilin verwandelt. Es findet sich gewöhnlich in der Literatur über diese Frage die gleiche Bemerkung, daß sich Urobilin aus Urobilinogen unter dem Einfluß des Lichtes und beim Stehen des Harns an der Luft bildet. *Saillet*[1]) hat als erster sich mit dieser Frage beschäftigt und geschrieben, daß sich dieser Übergang im Sonnenlicht in einigen Minuten, im Tageslicht in einigen Stunden vollzieht. Er hat die verschiedenen Lichtarten in ihrer Einwirkung auf Urobilinogen untersucht und festgestellt, daß, wenn die Wirkung des Sonnenlichts = 100 gesetzt wird, die des roten Lichtes mit 25, des gelben mit 78, des grünen mit 72, des blauen mit 94, des violetten mit 99 zu bewerten ist. Ebenfalls sollten Ammoniak und Säuren diese Umwandlung beschleunigen. Sonst findet sich in der Literatur über diese Frage sehr wenig. *Biró*[2]) ist in einer vor kurzem erschienenen Arbeit zu dem Ergebnis gekommen, daß das Urobilinogen im Harn sich allmählich spontan in Urobilin umwandelt, und zwar am Lichte kaum oder nicht viel rascher als im Dunkeln.

Angeregt durch dieses auffallende Untersuchungsergebnis von *Biró*, habe ich diese Frage eingehend studiert und machte folgende Beobachtungen: Es fiel mir zunächst auf, daß eine Reihe von Urobilinogenharnen sich ganz verschieden in bezug auf die Umwandlung in Urobilin verhielten.

1. Es wurden hell gefärbte Harne beobachtet, die sehr starke Urobilinreaktion gaben und hell gefärbt blieben, nach einem oder mehreren Tagen war im Tageslicht völlige Umwandlung in Urobilin eingetreten; andere Harne blieben ebenso hell gefärbt und ließen überhaupt eine völlige Umwandlung vermissen, sie gaben 14 Tage lang bei saurer Reaktion des Harns (im Tageslicht aufbewahrt) die *Ehrlich*sche Reaktion (Urobilin war dabei vorhanden!), der Harn ging dann in alkalische Gärung über und die Rotreaktion blieb weiter bestehen.

---

[1]) *Saillet*, Rev. de med. 1897.
[2]) *Biro*, diese Zeitschr. 1924.

Bei einzelnen Harnen wurde noch die merkwürdige Beobachtung gemacht, daß beim Stehen des sauren Harns nach einigen Stunden plötzlich die Aldehydreaktion verschwand und nach 2 bis 3 Stunden wiederkehrte, Urobilinogen hatte sich hier tatsächlich völlig in Urobilin umgewandelt, wie das Auftreten und Verschwinden des Urobilinstreifens lehrte, es war dies nicht durch eine Nebenreaktion des Aldehyds zu erklären; außer den bereits genannten Reaktionen gibt das *Ehrlich*sche Reagens bekanntlich in jedem Harn mit dem Harnstoff eine gelbe Farbenreaktion, die nicht weiter stört. Empfindlich stört nur das Auftreten einer Spur Nitrits (es genügte schon $^1/_4$ mg Na-Nitrit, zu einem Reagensglas Urobilinogenharn zugesetzt), wie ich festgestellt habe; eine Spur Nitrit gibt mit *Ehrlichs* Reagens eine gelbe Farbenreaktion, eine Nitrosoverbindung, welche die Urobilinogenreaktion absolut verhindert. Urobilin entsteht dabei nicht oder nur in Spuren, wie sich spektroskopisch beweisen läßt. Ich halte die Kenntnis dieser störenden Nebenreaktion für ganz besonders wichtig [vgl. die von mir beschriebene andere Nebenreaktion[1])].

Die oben genannte plötzliche, kurzdauernde Umwandlung des Urobilinogens bringe ich mit dem vorübergehenden Auftreten von Nitrit nicht in Zusammenhang. Sie ist eine Besonderheit des Gleichgewichtszustandes zwischen Urobilinogen—Urobilin.

2. Eine große Gruppe von Urobilinogenharnen war relativ dunkel und dunkelte in kurzer Zeit ziemlich intensiv bis zu tief braunroter Farbe nach. [Das Nachdunkeln anderer pathologischer Harne (Phenolharn[1]) ist leicht auszuschließen.] Die Mehrzahl der Urobilinogenharne zeigte dieses Nachdunkeln. Auffallend rasch erfolgte dasselbe bei einzelnen Lebererkrankungen, beim Harn Tuberkulöser. (Die Aldehydreaktion ist auch bei schwerer Tuberkulose ziemlich selten.) Prüfte ich die Umwandlungsgeschwindigkeit eines Urobilinogenharns durch fortlaufende Beobachtung der einzelnen Tagesportionen bei *einem* Kranken, so ergaben sich hier zeitlich keine auffallenden Unterschiede. Meist im Verlauf des zweiten Tages war die völlige Umwandlung eingetreten. Es hat sich bei den Versuchen herausgestellt, daß oft bei Zusatz von *Ehrlichs* Reagens zum Urobilinogenharn nur eine Spur Rotfärbung zu bemerken war, der Chloroformextrakt enthielt aber reichlich violettroten Farbstoff. Wir haben deshalb stets die gleichen Mengen Harn (5 ccm), Reagens (1 ccm) und Chloroform (4 ccm) gewählt; dann wurde zentrifugiert. Im Chloroform ist die spektroskopische Beobachtung immer leichter, sie zeigt auch gleichzeitig den Streifen des roten Farbstoffs (in Gelb) und den des Urobilins (an der Violettgrenze) und läßt die einzelnen Phasen der Umwandlung verfolgen.

---

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1922, Nr. 41.

Für den Verlauf der Umwandlung ist vom größten Einfluß das Sonnenlicht. Ich konnte aber niemals bestätigen, daß sich „in wenigen Minuten“ der Leukofarbstoff in Urobilin umwandelt; einige Urobilinogenharne verschiedener Kranker wiesen nach mehrstündiger Sonnenbestrahlung noch positive Aldehydprobe auf. Im Durchschnitt ließ sich bei den meisten Fällen eine völlige Umwandlung durch das Sonnenlicht in etwa 3 bis 4 Stunden erzielen.

Es müssen die chemisch wirksamen Strahlen die ultravioletten Strahlen sein, welche diesen Vorgang bewirken. Bestätigen ließ sich diese Ansicht durch Bestrahlungsversuche mit der Quarzlampe, meist nach etwa zweistündiger Einwirkung war auch hier Urobilinogen umgewandelt. (Es waren aber auch oft 6 und mehr Stunden notwendig.)

Gegenüber der Wirkung des Sonnenlichts tritt die Wirkung des diffusen Tageslichts sehr zurück; wenn *Biró* in der erwähnten Arbeit von Lichtwirkung spricht, so meint er wahrscheinlich die Wirkung des diffusen Lichtes, und ich befinde mich dann in Einklang mit seinen Ergebnissen. Besonders widersprechend mit der bisherigen Ansicht steht die Beobachtung, daß, allerdings sehr selten, der im Dunkeln stehende Harn rascher nachdunkelte als der im Tageslicht stehende.

Ich glaube die Tatsache, daß sich die einzelnen Harne jeweils so verschieden verhalten, damit erklären zu können, daß der Bakterientätigkeit ein besonderer Einfluß zuzuschreiben ist. Es wäre zunächst zu untersuchen, welcher Art diese Bakterientätigkeit ist. Ob die Bakterien als Katalysatoren wirken können, ob sie Sauerstoff in aktive Form überführen können und ob eine bakterielle Säuerung des Harns in Frage kommen kann. Daß eine saure Harngärung vorkommen kann, ist nicht allgemein anerkannt. Gewöhnlich läßt sich statt einer Zunahme eine Abnahme der Harnacidität beim Stehen des Harns beobachten, die saure Reaktion kann oft 2 bis 3 Wochen bestehen bleiben. Eine saure Harngärung wäre deshalb nicht auszuschließen, weil im nicht steril aufgefangenen Harn leicht 1. Vergärer (B. coli, Aerogenes, Streptokokken) vorkommen, 2. auch Spuren Zucker und Glykuronsäuren vorhanden sind. Wurde einem Urobilinogenharn Traubenzucker zugegeben und die Reaktion einige Zeit verfolgt, so blieb die Aldehydprobe 3 Tage wie die Kontrolle positiv. Ein Versuch, der gegen die Bedeutung der sauren Harngärung sprechen würde.

Die Wasserstoffionenkonzentration erschien ebenfalls nicht von Belang. War dagegen der Urobilinogenharn eine Reihe von Stunden im Brutschrank, so trat die Umwandlung gegenüber der Kontrolle früher ein. Ebenso ergab Zusatz verschiedener Bakterien bei Brutschrank- und Zimmertemperaturen das gleiche Resultat, besonders gegenüber dem steril aufbewahrten Harn. Am raschesten vollzog sich die Umwandlung durch Zusatz von einer Spur Fäces zum Urobilinogen-

harn. Hier war meist schon nach 6 bis 8 Stunden die Aldehydreaktion negativ, Zusatz von anderen Bakterien, wie Koli, Sarzinen [die nach *Heim*[1]) für die Aufspaltung des Harnstoffs eine vorbereitende Rolle haben sollen], wirkte bedeutend langsamer. Die Urobilinumwandlung trat um so rascher auf, je früher die folgende alkalische Harngärung zustande kam; es mußte hier die Abnahme der Harnacidität parallel gehen. Daß gerade Fäceszusatz die Beschleunigung der Umwandlung bewirkt, hängt auf alle Fälle mit der Frage des Synergismus aerober und anaerober Bakterien zusammen, die nach *Bienstock* und *Kämmerer*[2]) gerade für die Reduktion von Bilirubin zu Urobilinogen im Darm von größter Bedeutung ist. Unter dem Einfluß der gleichen Bakterien steht im Darm auch die Oxydation von Urobilinogen zu Urobilin; im Darm ist ebenso wie in manchem frischen Harn zwischen Urobilinogen—Urobilin ein Gleichgewichtszustand vorhanden. Im Harn kann es sich bei diesem Synergismus nur um Oxydation, nicht um Reduktion handeln. Der im Harn gelöste Sauerstoff spielt bei der Oxydation keine Rolle, denn nach längerem N-Durchleiten durch Urobilinogenharn zeigte sich, daß dieser Harn sich ebenso rasch wie die Kontrolle im Tageslicht umwandelte. Es läßt sich der Schluß ziehen, daß bei der Umwandlung

1. das Sonnenlicht von größtem Einfluß ist;
2. der Bakterientätigkeit beim Stehen des Harns bei Tageslicht und im Dunkeln eine wichtige Rolle zukommt.

Das verschiedene Verhalten einzelner Harne, einmal das rasche starke Nachdunkeln, dann die langsame Umwandlung des ganz hellen Harns oder die fehlende völlige Umwandlung des hellen Harns wird mit der Möglichkeit in Zusammenhang gebracht, daß hier verschiedene Pyrrolverbindungen vorliegen könnten. Es sei hier im Anschluß noch erwähnt, daß sich auch das im roten Kondensationsprodukt vorhandene Urobilinogen unter solchen Einflüssen in Urobilin verwandelt [vgl. *Biró*[3])]. Eine merkwürdige Erscheinung ist hierbei die Beobachtung des Verlaufs der Umwandlung durch ultraviolettes Licht. Obwohl im Harn nur noch Urobilin vorhanden und Chloroformextrakt gelb gefärbt war, blieb der Harn nach zweistündiger Bestrahlung stark rot. Sind sonst Spuren des roten Farbstoffs vorhanden, färbt sich Chloroform violettrot.

Wie Urobilinogen im Harn verhält sich auch das isolierte Mesobilirubinogen in seinen Zersetzungsreaktionen, besonders in alko-

---

[1]) *Heim*, Lehrb. d. Bakt.
[2]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **141**, 1923.
[3]) l. c.

holischer Lösung wandelt sich Mesobilirubinogen im Sonnenlicht schnell in Urobilin um [*H. Fischer*[1])].

Schließlich kommt noch eine letzte, dritte Gruppe von Harnen, allerdings sehr selten, vor, die eine leicht erkennbare Pseudourobilinogenreaktion geben. Weder der native, noch der mit *Ehrlichs* Reagens entstehende, rotgefärbte Harn zeigt eine Spur von Urobilinumwandlung. Der Urobilinstreifen wird hierbei im Gegensatz zu Gruppe 1 völlig vermißt.

Verhalten des Urobilinogens gegenüber Schwermetallsalzen und Säuren.

1. Schwermetallsalze und Säuren haben eine besondere Bedeutung für die Isolierung des Gesamturobilins. Ihre Einwirkung steht in nahem Zusammenhang mit der eben erörterten Urobilinogen—Urobilinumwandlung.

Hausmann[2]) hat festgestellt, daß starke Lösungen aller Schwermetallsalze und Säuren das Urobilinogen in Urobilin überführen und das Urobilin durch Chloroform extrahierbar machen und eine einfache Probe für Klinik und Praxis empfohlen, die auf diesem Verhalten basiert.

Diese Chloroformlöslichmachung durch Schwermetallsalze ist ein Hauptzeichen der Komplexsalzbildung.

Besonders geeignet erweist sich der Zusatz von Kupfersulfat und von Eisenchlorid zum Urobilinogenharn; hier ist im Chloroformextrakt regelmäßig ein breites Urobilinband zu bemerken, der Chloroformauszug gibt dann mit *Schlesingers* Reagens keine Fluoreszenz mehr.

Doch konnte die oben genannte Behauptung von *Hausmann* nicht bestätigt werden, da nach unseren Versuchen eine Anzahl Schwermetallsalze, wie Kobaltsulfat, Mangansulfat, Zinksulfat und andere, nur sehr wenig Urobilin in das Chloroform überführten. Niemals konnte von einer quantitativen Überführung des Urobilins dabei gesprochen werden.

Hausmann sucht die Chloroformextrahierbarkeit des Urobilins durch die Annahme zu erklären, daß es sich um kolloidchemische Vorgänge handelt, Schutzkolloide sollen durch Elektrolyte ausgeflockt werden, Suspensionskolloide, wie Urobilin, könnten dann unbehindert in das Chloroform übertreten. Die Tatsache der Komplexsalzbildung hat *Hausmann* überhaupt außer acht gelassen. Weiterhin ist fraglich, ob Urobilinogen—Urobilin im Harn nur kolloidal gelöst sind. Dagegen spricht, daß Urobilinogen zum Teil ohne weiteres in Chloroform löslich ist; bei Diffusionsversuchen mit Urobilinharn in 3proz. Gelatine hatten

[1]) Briefliche Mitteilung.
[2]) Zeitschr. f. klin. Med. 1922.

wir allerdings den Eindruck, daß Urobilin gegenüber Bilirubin, das ziemlich rasch diffundiert, nur sehr langsam in Gelatine übertritt. Eine Beobachtung, die dafür sprechen würde, daß Urobilin zum Teil kolloidal gelöst ist. Beim Übergang in den kolloidalen Zustand würden sich die Löslichkeitsverhältnisse des Farbstoffs stark ändern, vielleicht ist bald eine mehr kolloidale, bald mehr molekulardisperse Lösung des Urobilins im Harn vorhanden.

Hausmann hat ferner behauptet, daß nur die Überführung des Urobilinogens in Urobilin durch Kupfersalze in Formaldehyd- oder *Ehrlichs* Reagens-Gegenwart (bzw. nach vorherigem Zusatz) mißlingt, die Überführung durch andere Schwermetallsalze oder Säuren aber nicht. *Hausmann* nennt dies eine sehr merkwürdige Tatsache, die vorläufig nicht geklärt werden kann.

Daß hier Kupfersulfat sich eigenartig verhält, ist dadurch zu erklären, daß Mesobilirubinogen selbst kein Kupfersalz gibt, sondern erst ein durch Oxydation auftretendes Umwandlungsprodukt. Die Umwandlung kann also nicht gelingen, wenn *Ehrlichs* Reagens dem Urobilinogenharn vorher zugegeben wird. Die Feststellung *Hausmanns*, daß alle anderen Schwermetallsalze die Umwandlung in Urobilin ermöglichen, konnte ich nicht bestätigen. Es wurde eine größere Reihe von Schwermetallsalzen auf dieses Verhalten geprüft und stets einige Kubikzentimeter konzentrierter Salzlösung dem Harn mit dem roten Farbstoff zugegeben. Eine prompte Umwandlung ließ sich wohl bei Eisenchloridzusatz bemerken, eine teilweise Umwandlung wohl noch bei dem einen oder anderen Eisen- und Zinksalz; die meisten Salze, Ferrosulfat, Ferriacetat, Zinksulfat usw., ließen diese Einwirkung nicht erkennen. Chlorzinkzusatz brachte sowohl den Urobilinogen- wie den Urobilinstreifen zum Verschwinden. Zinnpentachlorid z. B. zeigte zwar im Harn nur den Urobilinstreifen, der Chloroformextrakt war aber völlig ungefärbt. Eine Reihe anderer Schwermetallsalze, wie Kobalt, Mangan, Cadmiumsalze, zeigt nicht die Spur einer Umwandlung. Zusatz einiger Salze konnte wegen der auftretenden starken Fällung nicht weiter verwertet werden.

Vielleicht erlaubt dieses Verhalten des Urobilinogens gegenüber Schwermetallsalzen noch eine sichere Abgrenzung gegenüber anderen Körpern, welche die Urobilinogenreaktion geben.

Das Verhalten des Urobilinogens im Harn gegen *Mineralsäuren* war folgendes:

Konzentrierte Salzsäure in genügender Menge wandelt Urobilinogen in kurzer Zeit in Urobilin um.

Bei Zusatz geringer Säuremengen tritt die Umwandlung allmählich ein. Ja, es gab vorheriger Zusatz von 20 Tropfen HCl (1,124) zu 100 ccm

Harn nach 36 Stunden, von 4 ccm HCl nach 2 Stunden noch intensive Rotreaktion mit *Ehrlichs* Reagens.

Bei abgestufter Zugabe kleiner Säuredosen lief uns auch das merkwürdige Ergebnis unter, daß in einer gewissen Zone (10 bis 30 Tropfen) nach 12 bis 18 Stunden noch keine völlige Umwandlung eingetreten war, während darüber und darunter die *Ehrlich*sche Reaktion negativ geworden war.

Es erinnert dieses Verhalten an den isoelektrischen Punkt amphoterer Körper, der auch durch ein Optimum oder Minimum verschiedener Reaktionen ausgezeichnet ist. Möglicherweise fällt das Optimum der H-Ionenkonzentration für die Oxydationen mit dem isoelektrischen Punkt zusammen.

2. Es fiel auf, daß bei vorhergehendem Zusatz von 2, 4, 8 ccm HCl zu 100 ccm Urobilinogenharn nach 1 bis 2 Tagen zwar eine Rotreaktion mit *Ehrlichs* Reagens nicht mehr bemerkt werden konnte, der Chloroformextrakt zeigte aber eine rosarote Färbung und spektroskopisch zwei direkt nebeneinander liegende Absorptionsbänder, die ich noch nicht beschrieben fand. Das rechte intensivere Band entsprach nach seiner Lage dem Urobilin, das linke, unschärfer begrenzte, ging in seinem linken Rande nach dem roten Spektralende hin bis etwa λ 550. Das rechte Band war nur durch einen schmalen Spalt vom Urobilinband abgrenzbar. Wir haben hier ein neues Umwandlungsprodukt vor uns, das natürlich auf alleinigen Zusatz von HCl nicht bemerkt werden konnte. Ferner wäre noch zu beweisen, ob das hier beobachtete linke Band aus dem Urobilinogenband hervorgegangen sein könnte; es müßte sich hier das Maximum des roten Farbstoffs bedeutend violettwärts verschoben haben; *Biró*[1]) hat nachgewiesen, daß sich das Maximum dieses ersten Streifens bei der Umwandlung überhaupt rotwärts verschiebt. Es können also die beiden Streifen nur als Modifikation des „sauren Urobilins“ angesehen werden, wenn man davon absieht, daß *Pröscher* drei Maxima des roten Farbstoffs beobachtet hatte.

Ablauf der Ehrlichschen Reaktion, Bestimmung des Urobilinogens im Harn.

Wird einem Urobilinogenharn das Ehrlichreagens zugegeben, so beobachtet man regelmäßig eine im Verlauf einer Minute stark zunehmende Rotreaktion. Wird mehr Reagens zugegeben, so wird der Reaktionsablauf beschleunigt und mit einer gewissen Menge maximale Farbintensität erzielt. Maximal war die Reaktion, wenn zu 5 ccm Harn 1 ccm Reagens gegeben wurde; stets wurde diese Menge beibehalten, um immer gleiche Bedingungen zu erfüllen. Wahrscheinlich tritt am Molekül des Mesobilirubinogens bei großem Reagenzzusatz weitere Pyrrolabspaltung ein.

[1]) l. c.

Wichtig ist, daß zunächst eine Rotfärbung nicht bemerkt zu werden braucht und erst nach einiger Zeit langsam die Reaktion eintritt und die stärkste Färbung erst nach 20 Minuten (!) erreicht ist.

Wird ein nativer Harn nach Zusatz von Aldehydreagens untersucht, so zeigt sich spektroskopisch, wie bereits erwähnt, ein breiter Streifen in Grüngelb mit einem Maximum bei λ 555, und eventuell ein zweiter Streifen an der Violettgrenze mit einem Maximum von λ 495, der entweder von präformiertem Urobilin herrührt oder aus dem ersten Streifen (Urobilinogen-Aldehydstreifen) hervorgegangen ist.

Der Chloroformextrakt läßt das spektroskopische Verhalten viel besser erkennen. (Rotreaktion des Harns, nicht durch Chloroform extrahierbar, kommt auch durch HCl zustande.)

Saillet[1]) hat zuerst festgestellt, daß im frischen normalen Harn nur das Chromogen (Urobilinogen) vorkommt; untersucht man frisch entnommenen Harn sofort, so läßt sich fast regelmäßig eine geringe Rotfärbung beobachten. Steht der Harn auch nur kurze Zeit, so tritt eine Rotfärbung in der Kälte nicht ein, dagegen beim kurzen Erhitzen des Harns; diese Reaktion ist ebenso als Urobilinogenreaktion bisher aufgefaßt worden, eine Ansicht, die nicht richtig ist. Denn wird der Harn oder Chloroformextrakt, der hier nicht rot, sondern gelbbraun ist, 1. spektroskopisch untersucht, so ist nur das auffallend breite Urobilinband zu sehen, 2. gibt überdies auch der pathologische Harn, dessen Urobilinogen völlig in Urobilin verwandelt ist, diese Rotfärbung. Es dürfte sich hier vielmehr um eine Reaktion des Indols handeln, das beim Erhitzen aus seinen Derivaten abgespalten wurde und in den meisten Harndestillaten nachzuweisen ist.

Auch in frischen pathologischen Harnen läßt sich häufig nur Urobilinogen nachweisen. Aus den Untersuchungen von *Biró*[1]) geht hervor, daß im frisch entleerten urobilinogenhaltigen, pathologischen Harn Urobilin spektroskopisch entweder bloß spurenweise oder gar nicht nachweisen läßt, eine Ansicht, die in der Mehrzahl der Fälle pathologischer Urobilinogenurie wohl zutrifft, die wir aber in einer Reihe von Erkrankungen nicht bestätigen konnten. Bei einer septischen Kranken fanden wir im Katheterharn bei unmittelbarer Untersuchung recht häufig große Mengen präformierten Urobilins, die sich zum Urobilinogen wie 1 : 3, 1 : 2, auch 1 : 1 verhielten. Graphisch dargestellt sind die Mengen beider in Abb. 1[2]). Es ist wahrscheinlicher, daß Urobilin bereits im großen Kreislauf vorhanden war, als daß es sich in den Harnwegen gebildet haben soll. Urobilin kommt meist neben Urobilinogen im frischen Harn vor, wenn Urobilinogen selbst nicht sehr stark vermehrt ist.

---

[1]) l. c.

[2]) Abb. 1 (durchgeführte Linien).

Bei der alkalischen Harngärung soll alles Urobilin wieder in Urobilinogen zurückverwandelt werden; auf dieser Annahme beruht bekanntlich die Urobilinogenbestimmung von *Charnas*[1]). Auch dies konnte ich nicht regelmäßig bestätigen. Wurde im frisch entleerten Urobilinogenharn spektroskopisch wenig präformiertes Urobilin vorgefunden, so zeigte sich auch bei der alkalischen Harngärung wieder dieselbe Menge Urobilin. Eine Beobachtung, die für die Frage des Gleichgewichtszustandes zwischen Urobilinogen und Urobilin nicht unwichtig ist.

Quantitative Bestimmungen des Urobilinogens—Urobilins sind eine ganze Reihe bekannt. Vor kurzem hat *Adler*[2]) durch eine Verdünnungsmethode mit der Fluoreszenzprobe des Urobilins quantitative Werte zu erreichen gesucht; abgesehen davon, daß im Harn andere fluoreszierende Körper ohne Reagenzzusatz vorkommen können und Oxydationsprodukte des Bilirubins eine Fluoreszenz geben[3]), ist am meisten zu beanstanden, daß der quantitativ bestimmte Körper, der die Fluoreszenz gibt, unbekannt ist. Es kann eingewendet werden, daß bei der Urobilinogenbestimmung die Fehlerquellen ebenfalls sehr zahlreich sind, dem steht aber gegenüber, daß der reagierende Körper genau bekannt ist, und daß die Kristallisation des resultierenden roten Farbstoffs naheliegt.

Unter den Methoden steht an Wert die spektrophotometrische obenan. Von einzelnen Autoren ist die Bestimmung des Urobilinogens nach alkalischer Gärung des Harns vorgenommen worden [*Brugsch-Retzlaff*[4]), *Jakobs-Scheffer*[5]), *Hueck* und *Brehme*[6])]. Es mußte dabei durch Ligroinextraktion eine Nebenreaktion ausgeschaltet werden. Abgesehen von der Umständlichkeit der Methode beteiligt sich an der Aldehydreaktion sehr wahrscheinlich auch Bakterieneiweiß. Der Harn ist stark trübe, die Umwandlung braucht nicht eine vollständige zu sein, wahrscheinlich ist die Lage des Absorptionsmaximums wenig verändert, schließlich kann im alkalisch reagierenden Harn (freies Alkali) die *Ehrlich*sche Reaktion auch einmal negativ ausfallen, wenn sie im gleichen Harn vorher positiv war. Wird dagegen der frisch entleerte Harn unmittelbar spektrophotometrisch untersucht, so ist die Lage des Maximums des Farbstoffs eine ziemlich konstante, auch die Intensität der Lichtabsorption kann sich nicht so rasch verändern. Kommt einmal präformiertes Urobilin vor, so läßt sich der Urobilinwert

---

[1]) Diese Zeitschr. 1909, S. 401.
[2]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 140.
[3]) *Barrenscheen* und *Weltmann*, diese Zeitschr. 1924.
[4]) Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. 11.
[5]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 44.
[6]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 141.

durch Relativzahlen berücksichtigen. Neben der spektrophotometrischen habe ich für fortlaufende Untersuchungen die einfache spektrometrische Methode bevorzugt.

Besonders bewährt hat sich mir für quantitativ aproximative Bestimmungen das Spektrometer nach Prof. *Scheibe*[1]), das ich wegen seiner einfachen Handhabung und Genauigkeit bestens empfehlen kann.

Der Apparat wird mit den Linien einer Heliumröhre oder mit anderen Linien bekannter Wellenlänge (*Frauenhofer*sche Linien) geeicht. In einem Koordinatensystem werden die Werte der Orientierungsskala des Apparats auf die Ordinaten, die zugehörigen Wellenlängen auf die Abszissenachse eingetragen und nach den bekannten Linien eine Eichkurve konstuiert, indem man die benachbarten Punkte zu einer Linie vereinigt bzw. interpoliert. Durch Verschieben des hellen Fadenkreuzes im Apparat lassen sich die Grenzen eines Absorptionsstreifens bis auf 1 $\mu\mu$ Genauigkeit festlegen. Durch die neue handliche verstellbare Küvette von *Zeiss* werden rasch die Grenzen der Absorption in verschiedener Schichtdicke bestimmt und können graphisch als numerische oder logarithmische Kurve dargestellt werden. Die Lage des Absorptionsmaximums läßt sich an der konstruierten Kurve leicht angeben (vgl. Abb. 1). Die Größen, welche in dem Koordinatensystem gegenseitig in Beziehung treten, sind Schichtdicke (Ordinate) und Wellenlänge (Abszisse). Für die Messungen ist zunächst die Kenntnis eines absoluten Wertes wichtig; es werden etwa 5 mg Mesobilirubinogen kolloidal gelöst, mit Aldehydreagenz versetzt, mit Chloroform extrahiert und die Chloroformlösung in der Meßküvette spektrometriert. Es werden dann die Linien gleicher Helligkeit verglichen, in der linken Kurve z. B. λ 565; die Konzentrationen verhalten sich hier umgekehrt wie die Schichtdicken. Es verhalten sich also die Konzentrationen $c_1 : c_2 = 10 : 1$ (da $c_1 \times d_1 = c_2 \times d_2$). Ist die Farbstofflösung zu konzentriert, so wird mit Chloroform ein- oder zweimal verdünnt. Wichtig ist, daß die zum Vergleich gewählte Linie möglichst entfernt vom Absorptionsmaximum sein soll. Wie bereits erwähnt, wird Urobilin, wenn es gleichzeitig vorhanden ist, durch Relativzahlen hinzugerechnet. Die spektroskopische Beobachtung der Urobilinogenumwandlung in Urobilin zeigt am Ende, wieviel Urobilinogen dem entstandenen Urobilin entspricht. Graphisch läßt sich aus dem Verhältnis der Höhen der Kurve der entsprechende Wert angeben.

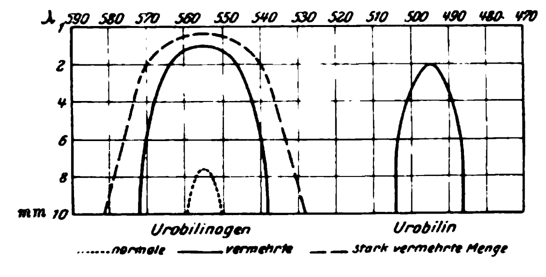


Abb. 1.

[1]) Hoppe-Seylers Zeitschr. 110, 1920.

Als Beispiel bringe ich Urobilinogenberechnungen von einem **Fall mit Leberlues und starkem Ascites; nach Ascitespunktion (↓ L) fallen die Urobilinogenwerte wenig ab. Im Ascites war nie Urobilinogen nachweisbar (vgl. Abb. 2). Ferner einzelne Werte der Urobilinogentagesmenge bei einer leichten Cholangitis: 8 Uhr abends 25 mg, 9 Uhr morgens 4,5 mg, 12 Uhr mittags 13 mg, 4 Uhr nachmittags 13 mg, Tagesmenge 55 mg.**

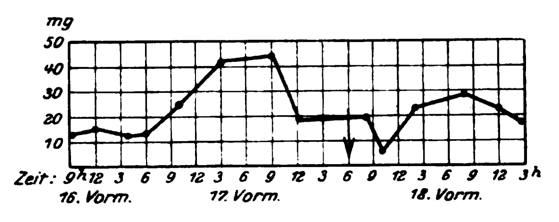


Abb. 2.

Die *spektrophotometrische* Bestimmung benutze ich nur zum Vergleich. Sie ist schon vielfach verwendet worden zur Bestimmung des Sterkobilirubinogens, dessen Menge bekanntlich ein Maß für die Blutmauserung abgibt. Bei der Bestimmung des Sterkobilirubinogens fanden einzelne Autoren schon beim Normalen ganz verschiedene Werte [*Eppinger*[1]), *Adler*[2]) *Hueck* und *Brehme*[3])]. Sie erklären sich, wie *Hueck* und *Brehme*[3]) bewiesen, durch eine andere Auswertung der Formel und durch verschiedene Methodik.

Ich habe mit dem Spektrophotometer von *Glan*[4]) eine Anzahl Bestimmungen durchgeführt, das sich bei meinen Messungen als zuverlässig erwiesen hat. Es ließ sich z. B. die Lage des Maximums im frischen Harn regelmäßig genau und übereinstimmend bestimmen.

Als Lichtquelle wurde eine Osram-Punktallampe verwendet.

Es ist zunächst mißlich, daß bei Angabe der Konzentration c = Anzahl Gramm in 1 ccm nicht von Farbstoff, sondern nur von Grammen Chromogen ausgegangen werden kann. Die erwähnten Unstimmigkeiten bei der Angabe der normalen Mengen durch einzelne Autoren rühren nicht allein von der falschen Benutzung der Formel $e = \frac{\log \operatorname{tg} \alpha - \log \operatorname{tg} \beta}{d}$, sondern auch von der Bestimmung des Wertes A, dem nur innerhalb gewisser Grenzen eine absolute Sicherheit zukommen kann. *Charnas* hat bei dem erhaltenen Wert A nicht angegeben, was er für einen Farbstoff erhalten hat. Voraussetzung für

[1]) *Eppinger-Charnas* (*Eppinger-Ranzi*, Kap. 2).
[2]) l. c.
[3]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **141**.
[4]) Mit der gütigen Erlaubnis von Geheimrat *E. Wiedemann* im physikalischen Institut ausgeführt.

die Berechnung von A ist, daß die Reaktion zu Ende verläuft, es muß die größtmögliche Säuremenge zugegeben werden, ohne daß Urobilin entsteht. Der allgemein angenommene Wert für A nach *Charnas* ist 0,00001, ich berechnete 0,00033 und komme damit dem von *Opitz*[1]) angegebenen mit 0,000088 am nächsten. Dieser Wert hat sich also nach der alten Methode berechnet ergeben. Ein Haupteinwand, der gegen die Methode gemacht werden kann, ist der, daß die spezifische Konzentration, d. h. die Anzahl Gramme Farbstoff in 1 ccm, unbekannt ist, da immer vom Mesobilirubinogen ausgegangen wird. In der bekannten Formel $E = \frac{1}{A} \cdot C$ ist C die Konzentration des Farbstoffs. Dafür nun die Konzentration des Chromogens einzusetzen, ist unzulässig. Wäre dagegen unter C die Molekularkonzentration verstanden, so könnte vielleicht angenommen werden, daß die Molekularkonzentration des Chromogens ungefähr = Molekularkonzentration des Farbstoffs ist (vorausgesetzt, daß die Kondensation von einem Molekül Mesobilirubinogen mit einem Molekül Dimethylamidobenzaldehyd stattgefunden hat!). Unter dieser Annahme lasse ich die Berechnung folgen: Ist E_λ der Extinktionskoeffizient, d die Schichtdicke, I_0 die auffallende Intensität, I_λ die Intensität des durchgegangenen Lichtes, so ist $I_\lambda = I_0 \, 10^{-E_\lambda d}$.

In E ist noch die Molekularkonzentration C enthalten, so daß $E_\lambda = B_\lambda \, C$ ist. B_λ ist der auf die Konzentration 1 bezogene Extinktionskoeffizient.

Die früheren Autoren haben $B = \frac{1}{A}$ gesetzt, so daß $E = \frac{1}{A} \cdot C$ ist. ($A \, . \, E = C$, welche Formel sich ständig zitiert findet.)

Es wurde bei der Untersuchung die Molekularkonzentration C (aus 0,02 g Mesobilirubinogen in 1 Liter Lösung) $= \frac{0{,}00002}{592}$ gewählt (592 Molekulargewicht des Mesobilirubinogens). Bei meiner Messung ergab sich für $E = 0{,}0957$ (demnach ist

$$A = \frac{1}{B} = \frac{C}{E} = \frac{0{,}00002/592}{0{,}0957} = 0{,}000\,0003\,53 = 3{,}53 \cdot 10^{-7})$$

wobei die Formel

$$E = \frac{\log \operatorname{tg} (\alpha_E - \alpha_0) - \log \operatorname{tg} (\alpha_c - \alpha_0)}{{}^1/_2 d}$$

zur Verwendung kam.

[1]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 41, 1924.

d = die Dicke des *Schulz*schen Körpers,
a_c = die Stellung des schwächenden Nikols bei Bestimmung der Apparaturkonstanten,
a_E = die Stellung des Nikols auf gleiche Helligkeit bei der Messung der Farblösung.

Ich glaube, mit diesen Zahlen brauchbare Werte erhalten zu haben. Es bleibt natürlich noch dahingestellt, ob sie einen absoluten Wert darstellen, da infolge der oben angeführten Gründe die Molekularkonzentration des Chromogens nicht = Molekularkonzentration des Farbstoffs anzusehen ist.

Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Kohlehydrat und Phosphorsäurestoffwechsel.

I. Mitteilung:

Über die Spaltung der Hexosediphosphorsäure im Säugetierorganismus.

Von

Otto Fürth und Josef Marian.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener Physiologischen Universitäts-Institutes.)

Ausgeführt mit Unterstützung der Seegen-Stiftung der Akademie der Wissenschaften in Wien.

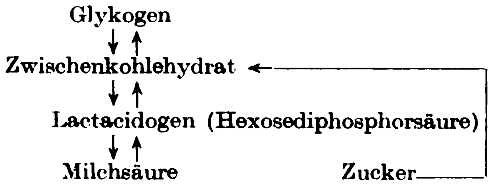
(Eingegangen am 20. Oktober 1925.)

Inhalt.

I. Einleitung.

Die alte Lehre *Hoppe-Seylers*, derzufolge die *Milchsäurebildung aus Kohlehydraten im anaeroben Stoffwechsel* als eine der Fundamentalfunktionen des lebenden Protoplasmas zu gelten habe, ist seinerzeit viel bekämpft worden. Doch hat es ihr unter den Physiologen auch niemals an Anhängern gefehlt. Gegenwärtig ist die Bedeutung dieses Spaltungsvorganges sowohl für die Vorgänge des Kohlehydratabbaues im Organismus, als auch für die Muskelkontraktion allgemein anerkannt. Die Untersuchungen *Gustav Embdens* in Frankfurt und seiner zahlreichen Mitarbeiter haben dargetan, daß die Milchsäure im Muskel auf Kosten einer Vorstufe, des *Lactacidogens*[1]), entsteht, das mit besonderer Leichtigkeit Milchsäure bildet. Dieses ist nun weiterhin als ein Paarungsprodukt zwischen Zucker und Phosphorsäure, als „Hexosediphosphorsäure" erkannt worden, welches unter bestimmten Bedingungen in äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure zu zerfallen vermag.

Die zwischen Traubenzucker, Glykogen, Hexosediphosphorsäure und Milchsäure bestehenden Beziehungen sind von *Laquer* in dem Schema



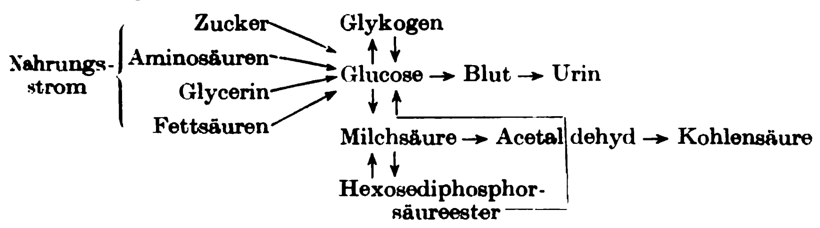
ormuliert worden[2]).

Während der letzten Jahre ist jedoch auch die große *Bedeutung der Hexosediphosphorsäure für die Pathologie des Kohlehydratstoffwechsels* vielfach erkannt worden. Ohne auf diesen Gegenstand hier näher eingehen

[1]) Vgl. die einschlägige Literatur bei *O. Fürth* in Oppenheimers Handb. d. Biochem., II. Aufl., 4, 310 bis 315, 1924.

[2]) *F. Laquer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 122, 26, 1922.

zu können, möchten wir nur als Beispiel anführen, daß *Th. Brugsch*[1]) den *Diabetes mellitus* im Sinne *Naunyns* als aglykogenische Erkrankung ansieht, wobei das glykogenaufbauende Agens, das Pankreashormon fehlt. Für den Kohlehydratumsatz in der Leber beim Diabetes wird folgendes anschauliche Schema aufgestellt:



Die normale Säugetierleber, in traubenzuckerhaltiger Ringerflüssigkeit aufgeschwemmt, bildet bei Luftdurchleitung Milchsäure und gibt Trauben-Zucker ab. Unter *Insulin*einwirkung sinkt der Traubenzuckergehalt ab unter Bildung von *Hexosediphosphorsäure*[2]).

Diese Befunde gewinnen noch an allgemeiner Bedeutung durch die Erkenntnis, daß, ebenso wie für den Kohlehydratstoffwechsel des *Muskels* und der *Leber* die intermediäre Bildung eines Hexosediphosphorsäureesters auch für die Vorgänge des Kohlehydratabbaues in *lebenden Hefezellen* von großer Bedeutung ist. *Harden* und *Young* haben seinerzeit die Entdeckung gemacht, daß die *Phosphorsäure* unmittelbaren Anteil am Gärungsvorgang nimmt. Ihre Untersuchungen sowie diejenigen von *Iwanoff* haben weiterhin den beim Gärungsvorgang auftretenden Zuckerphosphorsäurekomplex als *Hexosediphosphorsäureester* dargetan. Neuere Untersuchungen von *G. Embden* und *Margarete Zimmermann*[3]), bei denen das *Lactacidogen aus Muskelpreßsaft* als Brucinsalz isoliert worden ist, haben die Identität desselben mit dem Brucinsalz der Gärungs-Hexosediphosphorsäure und damit die *Identität von Lactacidogen und Gärungs-Hexosediphosphorsäure* ergeben.

Bei allen derartigen Vorgängen spielt ein „*Coferment*" eine bedeutsame Rolle, wie insbesondere die schönen Untersuchungen von *H. v. Euler* und *K. Myrbäck*[4]), von *O. Meyerhof* und *O. Warburg* dargetan haben. *A. Gottschalk*[5]) hebt neuerdings bei zusammenfassender Betrachtung der Beziehungen zwischen pflanzlichem und tierischem Kohlehydratabbau mit Recht hervor, daß alle diese Versuche „es wahrscheinlich gemacht haben, daß auch in der tierischen Zelle das Coferment den Zucker verestert, d. h. für die Lact-

[1]) *Th. Brugsch, H. Horsters* und *Th. Katz,* diese Zeitschr. **149**, 1924.

[2]) *Th. Brugsch* und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **147**, 117, 1924.

[3]) *G. Embden* und *Margarete Zimmermann,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **142**, 234, 1924.

[4]) *H. v. Euler* und *K. Myrbäck,* ebendaselbst **139**, 15, 1924; Ber. d. deutsch. chem. Ges. 1924.

[5]) *A. Gottschalk,* Wien. klin. Wochenschr. 1925, Nr. 14.

acidogenbildung verantwortlich ist; wir verstehen, weshalb cofermentfreies Gewebe keine Milchsäure bilden kann. Sowohl in der Hefe wie in der Muskulatur wird der Kohlehydratumsatz mit der Zuckerveresterung eingeleitet; das Coferment erscheint als integrierender Bestandteil bei dieser Reaktion".

Falls wir aber wirklich den Aufbau des Hexosediphosphorsäurekomplexes als fundamentale Eigenschaft tierischer und pflanzlicher Zellen anerkennen sollen, müssen wir von denselben auch die Fähigkeit fordern, *Hexosediphosphorsäurekomplexe* zu spalten. Versuche in dieser Richtung sind der Gegenstand vorliegender Untersuchung gewesen. Bevor wir jedoch auf unsere eigenen Experimente eingehen, wollen wir zunächst das diesbezüglich bisher vorliegende Material überblicken.

Literaturangaben über Spaltung der Hexosediphosphorsäure durch den tierischen Organismus und einzelne Organe.

Eingehendere Untersuchungen über die Spaltung des durch Veresterung des Zuckers mit zugesetzter Phosphorsäure auf biologischem Wege erhaltenen Kohlehydratphosphorsäureesters sind zunächst von *H. v. Euler* und seinen Mitarbeitern ausgeführt worden.

Untersuchungen von *H. v. Euler* und *Y. Funke*[1]) haben die geringe Wirksamkeit von *Blut*, *Pepsin*, *Pankreas*, *Darmschleimhaut* und *Nieren*mazerationen in bezug auf die Spaltung des Kohlehydratphosphorsäureesters ergeben. Weiterhin erhielten drei Kaninchen per os je 1 g des Calciumsalzes des Esters, mit Wasser aufgeweichtem Brote beigemischt. Die Phosphorsäurebestimmung im Harn ergab, daß mindestens drei Viertel des aufgenommenen Esters einer Spaltung unterlegen waren. Da aber erfahrungsgemäß das an sich schwer lösliche Calciumsalz in großem Umfang von den Darmbakterien gespalten wird[2]), ist aus dem Versuch nicht zu entnehmen, ob tatsächlich eine Resorption und Spaltung in den Organen erfolgt ist. Spaltungsversuche mit *Muskeln* und *Leber*, die mit flüssiger Luft gekühlt und pulverisiert worden waren, fielen negativ aus.

Weitere Versuche von *H. v. Euler*[3]) haben dargetan, daß die *Darmschleimhaut* des Schweines wie des Kaninchens ein meßbares, aber geringes Spaltungsvermögen gegenüber Kohlehydratphosphorsäureester besitzt (während derselbe durch *Bacterium coli* prompt gespalten wird). Erheblich größer als die Spaltungsfähigkeit der Darmschleimhaut ist diejenige der *Pferdeniere*; jedoch liegt auch hier noch eine relativ langsam verlaufende Enzymreaktion vor.

Weiter wurden fünf Versuche an zwei großen Hunden ausgeführt. So erhielt z. B. (in der Versuchsreihe 2) der Hund 1,76 g PO_4 mit der täglichen Nahrung; dazu an den Versuchstagen als Calciumsalz des Phosphorsäureesters (Candiolin) 1,75 g PO_4. In der *Vorperiode* wurden ausgeschieden: im Mittel 1,70 g PO_4 im Urin, 0,50 g PO_4 im Kote, zusammen 2,20 g PO_4.

---

[1]) *H. v. Euler* und *Y. Funke*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**, 489, 1912.
[2]) *H. v. Euler*, ebendaselbst **79**, 377, 1912.
[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **79**, 375, 1912.

An den *sieben Versuchstagen* im Mittel: im Urin 2,43, im Kote 0,82, zusammen 3,41 g PO_4. Das *Plus* im Harn betrug 2,43 — 1,70 = 0,73 g PO_4, im Kote 0,82 — 0,50 = 0,32 g PO_4, zusammen also 0,73 + 0,32 = 1,05 g PO_4. Die in Form von Candiolin eingeführte PO_4-Menge betrug 1,75 g; es würde dies sonach eine *PO_4-Retention* bedeuten. *Euler* folgert aus diesen Versuchen: 1. daß Kohlehydratphosphorsäureester allerdings im Darme zum Teil gespalten, zum Teil aber auch als solcher *resorbiert* wird; 2. daß der resorbierte Ester zum größten Teil als *anorganisches* Phosphat den Körper verläßt. Jedoch auch die Menge des *organisch* gefundenen PO_4 erschien vermehrt: von der Gesamtphosphorsäure des Harns entfielen (gegenüber einem Normalwerte von 2,7 Proz. beim Hunde) nunmehr etwa 10 Proz. auf diese Fraktion.

Bei weiteren Versuchen von *Hans* und *Beth Euler*[1]) ergab Extrakt von *Ahornblättern* nur schwache Phosphatasewirkung; dagegen wurde das allmähliche Auftreten des esterspaltenden Ferments, der Phosphatase, in *keimendem Gerstensamen* festgestellt.

V. J. Harding[2]) hat die Einwirkung von *Lipase aus Ricinussamen* und autolysiertem *Ochsenpankreas*, von *Emulsin* und autolysiertem *Hefepreßsaft* auf *Hexosephosphorsäure* untersucht. Die letztere war mit NaOH gegen Lackmus neutralisiert worden; die Versuche wurden bei 25 bis 37° in Gegenwart von Toluol ausgeführt. Während das autolysierte Pankreas ohne Einwirkung auf die Hexosephosphorsäure geblieben war, vermochten die übrigen Fermente eine langsame Hydrolyse herbeizuführen. Aus autolysiertem Hefepreßsaft ließ sich durch Alkohol unter Ätherzusatz ein Niederschlag ausfällen, welcher sich gegenüber Hexosephosphorsäure hydrolytisch wirksam erwies.

R. H. A. Plimmer[3]) führte zwei Versuche mit einem von *Young* dargestellten Hexosephosphorsäurepräparate aus. Die Lösung der Säure wurde neutralisiert und mit neutralen Extrakten aus *Darmschleimhaut* bzw. *Gehirn* unter Toluolzusatz bei 37° digeriert. Im Laufe von einigen Tagen konnte eine nicht unerhebliche Abspaltung anorganischer Phosphorsäure festgestellt werden.

In Versuchen ganz neuen Datums ist es *H. v. Euler* mit *K. Myrbäck* und *Signe Karlsson*[4]) auch gelungen, festzustellen, daß zugesetztes Zymophosphat (fructosediphosphorsaures Natrium von *Fr. Bayer & Co.*, Leverkusen) vom *Muskelfleisch* gespalten wird, und daß diese Spaltung in hohem Grade durch Natriumfluorid gehemmt wird. Wie auch *Embden* bemerkt hat, entsteht dabei viel weniger Milchsäure, als dem abgespaltenen P_2O_5 entspricht. Es wurde auch untersucht, ob bei der Phosphorsäureabspaltung etwa ein reduzierender Zucker entsteht. (Da auch „Lactacidogen" *Fehling*sche Lösung reduziert, wurde dieses zuerst mit Bleiacetat ausgefällt.) Es wurde jedoch kein reduzierendes Filtrat erhalten.

Daß der Muskel die *in ihm enthaltene* Hexosediphosphorsäure in großem Umfange unter Milchsäurebildung zu spalten vermag, geht heute, da das

---

[1]) *Hans* und *Beth Euler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**, 292, 1914.

[2]) *V. J. Harding*, (Lister-Institute) Proc. Roy. Soc. London **85**, 418, 1912; Chem. Centralbl. **1912**, II, 1293.

[3]) *R. H. Aders Plimmer*, Biochem. *Journ.* **7**, 57, 1913.

[4]) *H. v. Euler*, *K. Myrbäck* und *Signe Karlsson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **148**, 254, 1925; Svensk Kemisk Tidskrift 1924, H. 11, 299.

Lactacidogen als Hexosediphosphorsäure erkannt ist, aus einer lange
Reihe von Untersuchungen des *Embden*schen Laboratoriums mit Sicherhe
hervor. Die Versuche von *G. Embden*, *W. Griesbach* und *E. Schmitz*
zeigen aber auch, daß im *Muskelpreßsafte* die Aufspaltung zugesetzte
Hexosephosphorsäure unter Bildung von Milchsäure und Phosphorsäure ta
sächlich erfolgt; dabei überwiegt die Menge gebildeter Phosphorsäure die
jenige der Milchsäure ganz erheblich. Zugesetzte Hexosephosphorsäur
vermochte als einzige der daraufhin untersuchten Substanzen (einschließlic
Dextrose und Glykogen) die Milchsäurebildung im Muskelpreßsafte z
steigern. *H. Hagemann*[2]) in *Embdens* Laboratorium fand weiterhin, daß i
ähnlicher Weise auch *Uteruspreßsaft*, der beim Stehen ohne Zusatz kaum
Milchsäure bildet, aus hinzugefügtem Hexosephosphat Milchsäure- und
Phosphorsäuremengen entstehen läßt, die den im Preßsaft quergestreifte
Skelettmuskeln aus Hexosephosphorsäure gebildeten sehr ähnlich sind.

Durch neue Untersuchungen *Embdens*[3]) und seiner Mitarbeiter ist ferner dargetan worden, daß es sich beim Auf- und Abbau der Hexosediphosphorsäure im Organismus um einen *reversiblen Fermentprozeß* handelt, der durch den Zusatz bestimmter anorganischer Salze aufs stärkste beeinflußt werden kann. Während z. B. unter der Einwirkung von *Fluornatrium* im frischen Preßsafte aus Säugetiermuskeln die Synthese von Lactacidogen bis zum Verschwinden von anorganischer Phosphorsäure gesteigert werden kann, beschleunigt Kochsalz die Lactacidogenspaltung. Es besteht ein vollkommener Parallelismus zwischen der Fähigkeit einzelner *Anionen*, die Tätigkeit eines durch Einlegen in Rohrzuckerlösung gelähmten Muskels wieder herzustellen einerseits und der Fähigkeit, die Spaltung des Lactacidogens zu beschleunigen.

Die Behauptung *M. Kretschmers*, derzufolge das *Candiolin* (das Kalksalz einer Hexosediphosphorsäure) im *Magendarmkanal* von Kindern nicht gespalten werde, widerspricht den experimentellen Befunden *Eulers* und erscheint unzureichend begründet.

C. Neuberg und *H. Pollak* haben durch künstliche Phosphorylierung Salze der *Rohrzuckerphosphorsäure* dargestellt (Hesperonal *E. Merck*). *A. Nemec* und *F. Duchon*[4]) vermochten nun in verschiedenen *Samen*, sowie in *Kartoffelblättern* Enzyme nachzuweisen, die imstande waren, derartige Verbindungen zu spalten. Die stärkste Wirkung zeigten fett- bzw. ölführende Samen; jedoch auch Samen mit stärkeführenden Reservestoffen sowie die eiweißreichen Hülsenfrüchte ließen eine kräftige Fermentwirkung nicht vermissen. Eine Saccharophosphatase in der Hefe war schon früher von *C. Neuberg* und *K. Djenab*[5]) nachgewiesen worden.

Weiterhin hat *M. Tomita*[6]) in *Neubergs* Laboratorium gezeigt, daß auch *tierische Organe* und daraus bereitete Säfte die Fähigkeit besitzen, aus den Salzen der Rohrzucker-monophosphorsäure anorganisches Phosphat

---

[1]) *G. Embden*, *W. Griesbach* und *E. Schmitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 39, 1914.

[2]) *H. Hagemann*, ebendaselbst **93**, 58, 1914.

[3]) *G. Embden* und *Cläre Haymann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **137**, 154, 1924; *G. Embden*, Naturwiss. **11**, 985, 1925.

[4]) *A. Nemec* und *F. Duchon* (Prag), diese Zeitschr. **119**, 73, 1921.

[5]) *C. Neuberg* und *K. Djenab*, diese Zeitschr. **82**, 391, 1917.

[6]) *M. Tomita*, ebendaselbst **131**, 161, 170, 1922.

abzuspalten. Nach der Stärke des Spaltungsvermögens ordnen sich die Organe etwa folgendermaßen: Niere, Leber, Milz, Pankreas, Gehirn, Muskel; der Muskel stand also auffälligerweise an letzter Stelle.

Es war *Neuberg* gelungen, durch Abbau des Hexosediphosphats (Candiolin von Fr. Bayer & Co.) mit verdünnter Oxalsäure *Hexosemonophosphorsäure* darzustellen. Es zeigte sich, daß die Organe von Warm- und Kaltblütern ein Ferment enthalten, welches auch diese Verbindung zu spalten vermag. Auch hier wiederum erwies sich die Niere als besonders kräftig, der Muskel aber am schwächsten. Diese Befunde sind von *Y. Takahashi*[1]) in *Neubergs* Laboratorium bestätigt worden.

E. Forrai[2]) verglich das Verhalten verschiedener *Organpulver aus menschlichen Organen* bei 48stündiger Digestion bei 37° gegenüber einer Lösung von fructosediphosphorsaurem Natrium (aus dem Ca-Salz durch Natriumoxalat erhalten). Mit Leber, Milz, Schilddrüse und Hoden wurden sehr kräftige, mit Muskeln schwächere Spaltungseffekte erzielt. Eine wirksame Phosphatase ist auch von *Brugsch* und *Horsters*[3]) sowohl in normaler als auch in pankreopriver Leber angetroffen worden.

Von besonderem physiologischen Interesse erscheint die von *R. Robison*[4]) kürzlich aufgedeckte mögliche Bedeutung der Hexosephosphorsäurespaltung für die *Vorgänge der Knochenverkalkung*. Wenn man frisches Gewebe von jungen Knochen oder Epiphysenknorpeln einen Tag im Brutschranke mit einer Lösung von Hexosemonophosphorsäure unter Chloroformzusatz stehen läßt, so wird freie Phosphorsäure abgespalten. Nach vorherigem Kochen der Gewebe bleibt diese Spaltung aus. Auch andere Gewebe enthalten das gleiche Ferment, jedoch in viel kleinerer Menge als Knochen und Knorpel. Rachitischer, nicht ossifizierender Knorpel ist viel weniger wirksam, als normaler. Derselbe deponiert Calcium aus dem Ca-Salze der Hexosemonophosphorsäure in der breiten osteogenen Zone, nicht im proliferierenden Knorpel selbst. Auch in den *Zähnen*, besonders sehr junger Tiere konnte ein derartiges Ferment nachgewiesen werden. Das Enzym ist auch befähigt, Äthylbutyrat und Triacetin, nicht aber Olivenöl oder Lecithin zu spalten. Wässerige Lösungen desselben unter Chloroformzusatz halten sich bei 0° mehrere Monate lang unverändert.

Nach *Martland, Hausmann* und *Robison*[5]) enthält das Blut ein Enzym, welches sehr wirksam ist gegenüber hexosediphosphorsaurem Calcium, sehr wenig wirksam dagegen gegenüber hexosemonophosphorsaurem Calcium. *F. Demuth*[6]) fand ein hexosediphosphorsaures Na spaltendes Enzym in allen daraufhin untersuchten Organen und Gewebsflüssigkeiten.

Überblicken wir nunmehr die vorliegenden Beobachtungen, so sehen wir, daß *Phosphatasen*, d. h. Enzyme, die befähigt sind, Hexose-

---

[1]) *Y. Takahashi*, diese Zeitschr. **145**, 178, 1923.

[2]) *E. Forrai* (Budapest-Szeged), ebendaselbst **145**, 47, 54, 1923.

[3]) *Th. Brugsch* und *H. Horsters* (Charité Berlin), diese Zeitschr. **155**, 459, 1925.

[4]) *R. Robison* mit *Katherine M. Soames* (Lister Institute London), Biochem. Journ. **17**, 286, 1923; **18**, 740, 1924; Chem. Centralbl. **1923**, III, 873; **1924**, II, 1473.

[5]) *M. Martland, F. S. Hausmann* und *R. Robison*, Biochem. Journ. **18**, 1152, 1924.

[6]) *F. Demuth*, diese Zeitschr. **159**, 415, 1925.

diphosphorsäureester unter Abspaltung anorganischer Phosphorsäure zu zerlegen, in zahlreichen *Organbreiversuchen* mit wechselndem Erfolge gesucht worden sind. Über den Umfang, in dem der *lebende Organismus* die Spaltung des Esters auszuführen vermag, und über die Schicksale der dabei abgespaltenen Phosphorsäure sind wir aber so gut wie gar nicht orientiert. Die einzigen in dieser Richtung vorliegenden Versuche, diejenigen *Eulers*, vermögen keinen eindeutigen Aufschluß zu geben, da dabei die Hexosediphosphorsäure *per os* zugeführt worden ist und der Vorgang der eigentlichen Spaltung in den *Organen* durch die gleichzeitig sich vollziehende Spaltung durch *Darmbakterien* überlagert worden ist.

Wir haben es daher zunächst als unsere Aufgabe betrachtet, über das *Schicksal parenteral zugeführter Hexosediphosphorsäure im Säugetierorganismus* im Wege des Versuchs Aufschluß zu gewinnen.

II. Analyse des hexosediphosphorsauren Natriums (Candiolin-Natrium Bayer & Co.).

Konstanten:

Formel[1]) $C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2$. Molekulargewicht 428; log des Molekulargewichts 63144.

Gesucht	log der Mol.-Gew.	Gegeben	Faktor	log des Faktors
$C_6H_{12}O_6$	25 527	$C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2$	0,420 56	62 383
$C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2$	63 144	$C_6H_{12}O_6$	2,377 80	37 617
P_2O_5	15 253	$C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2$	0,332 96	52 109

Für sämtliche Versuche wurde das Präparat „*Hexosediphosphorsaures Natrium*“ (*Candiolin-Natrium*) der Firma *Bayer & Co., Leverkusen*[2]), verwendet, das auf physiologischem Wege durch Vergärung von Kohlehydraten bei Gegenwart von Phosphaten dargestellt wird. Es erscheint durch die nachfolgend angeführten Analysen bewiesen zu sein, daß das Präparat ungefähr die von der Formel $C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2$ postulierte Zusammensetzung besitzt. Insbesondere wurde durch eine auf elementaranalytischem Wege ausgeführte Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung sichergestellt, daß das Präparat eine der Formel entsprechende Menge des Kohlehydratkomplexes enthält, was im recht auffallenden Gegensatz zum *geringen Reduktionsvermögen und zur*

[1]) *H. v. Euler*, Therapie der Gegenwart, Juni 1916.

[2]) Wir danken hier für das freundliche Entgegenkommen der Firma aufs herzlichste.

unvollständigen Oxydierbarkeit der Substanz mit Hehnerscher Bichromatlösung steht.

Der *Feuchtigkeitsgehalt* der Substanz wurde aus dem Gewichtsverlust beim Trocknen bei einem durchschnittlichen Vakuum von 15 mm Hg-Druck und einer Temperatur von 40 bis 45° C über Phosphorpentoxyd während mehrerer Monate zu 3,621 Proz. ermittelt. Absolute Gewichtskonstanz konnte, da die Substanz äußerst hygroskopisch ist, in keinem Falle erzielt werden.

Reduktionsvermögen nach Bertrand.

Von der noch nicht getrockneten Substanz wurden 1,0121 g in 100 ccm destillierten Wassers gelöst. Mit Berücksichtigung des Wassergehalts war die Lösung also 0,9754 proz. Also enthielten 100 ccm der Lösung x 0,9754 g Substanz, entsprechend 0,9754 × 0,4205 = 0,4102 Zucker berechnet als Dextrose.

In a) 20 ccm der Lösung x wurden nach *Bertrand* gefunden als Dextrose berechnet	0,028 g	Zucker
b) 20 ccm der Lösung x wurden nach *Bertrand* gefunden als Dextrose berechnet	0,029 g	„
Im Mittel in 100 ccm Lösung.	0,1425 g.	„
statt der theoretisch berechneten Menge von	0,4102 g	„

Reduktionsvermögen nach der Hydrolyse.

Um das Reduktionsvermögen der Substanz nach der Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure zu bestimmen, wurden 20 ccm der Lösung x mit so viel konzentrierter Salzsäure versetzt, daß eine 3 proz. Lösung an Salzsäure resultierte. Dann wurde am siedenden Wasserbade 6 Stunden lang im lose bedeckten Kolben hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurden 20 ccm Kupfersulfatlösung nach *Bertrand* zugesetzt, mit konzentrierter Natronlauge neutralisiert und mit 20 ccm *Bertrand*scher Seignettesalzlösung versetzt und durch 3 Minuten langes Kochen reduziert.

In a) 20 ccm der Lösung x wurden nach der Hydrolyse auf diese Art gefunden und als Dextrose berechnet	0,0315 g	Zucker
b) 20 ccm der Lösung x wurden nach der Hydrolyse auf diese Art gefunden und als Dextrose berechnet	0,0375 g	„
Im Mittel für 100 ccm Lösung wurden also gefunden	0,1725 g	„
statt der theoretisch berechneten	0,4102 g	„

Die Zunahme des Reduktionsvermögens ist durch die Hydrolyse also ganz minimal. Daß die Reaktion bei der Hydrolyse ein End-

stadium erreicht hat, wurde durch protrahierte Hydrolyse sichergestellt, wobei das Reduktionsvermögen keine merkliche Veränderung erfuhr.

Phosphorsäurebestimmung.

Der Phosphorsäuregehalt der Substanz wurde nach *Neumann* auf titrimetrischem Wege[1]) nach erfolgter Säureveraschung ermittelt[2]).

Da die Lösung der Substanz mit Magnesiamixtur eine kaum wahrnehmbare Phosphatreaktion gab, wurde auf die getrennte Bestimmung der organisch- und anorganisch gebundenen Phosphorsäure verzichtet.

In aliquoten Teilen der Lösung x in

a) 10 ccm wurden gefunden . . . . 0,0315 g P_2O_5
b) 10 „ „ „ . . . . 0,0329 g P_2O_5
Im Mittel in 100 ccm Lösung also wurden gefunden . . . . 0,3227 g P_2O_5
statt der theoretisch berechneten . . . . . . 0,3248 g P_2O_5

also in recht guter Übereinstimmung.

Elementaranalyse (Bestimmung von C und H).

Aus der Bruttoformel $C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2 = 428$ berechnet sich der theoretische Kohlenstoffgehalt der Substanz zu . . . . 16,82 Proz.
der Wasserstoffgehalt zu . . . . 2,34 „

Zur Elementaranalyse wurde diejenige Substanzmenge verwendet, welche zur Bestimmung des Wassergehalts monatelang im Vakuum über Phosphorpentoxyd bei 40 bis 45° C getrocknet worden war. Beim Versuch, die Substanz bei höherer Temperatur, etwa bei 80 bis 100° C, zu trocknen, trat auch im Vakuum Karamelisierung ein unter starker Bräunung und Sinterung der Substanz. Um die vollständige Verbrennung und die Austreibung der gesamten gebildeten Kohlensäure aus der natriumhaltigen Substanz zu erreichen, wurde dieselbe nach dem Einwägen in Porzellanschiffchen mit Hilfe eines Platindrahtes mit ausgeglühtem Bleichromat + Kaliumdichromat vermischt und zum Schluß noch mit der Chromatmischung überschichtet.

Die ungemein hygroskopische Substanz wurde so rasch als möglich in das Schiffchen eingewogen, mit Chromatmischung vermengt und in die adjustierte Verbrennungsröhre geschoben. Trotz größter Sorgfalt war es anscheinend nicht vollkommen auszuschließen, daß die Substanz etwas Feuchtigkeit aus der Atmosphäre aufnehme, was sich durch die zu hoch ausgefallenen Wasserstoffbestimmungen geltend machte.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 129, 1902/03; 43, 35, 1904/05.

[2]) *Brugsch-Schittenhelm*, Klin. Laboratoriumstechnik, II. Aufl., 2, 797, 1924.

In zwei **Parallelbestimmungen** wurden gefunden:

a) Kohlenstoff **17,50 Proz.** Wasserstoff **3,08 Proz.**
b) „ **16,93** „ „ **3,19** „

Vom Wasserstoffwert aus besagtem Grunde abgesehen, also in ziemlicher Annäherung an die theoretischen Werte der Formel.

Versuche zur quantitativen Bestimmung des Kohlehydratkomplexes der Hexosediphosphorsäure durch Oxydation mit Hehnerscher Bichromatlösung (J. Marian unter Mitwirkung von D. Laszló).

Bei diesen Versuchen gingen wir von der Annahme aus, daß es möglich wäre, Kohlehydrate bei Abwesenheit anderer oxydierbarer Substanzen nach Analogie der *Hehner*schen Glycerinbestimmung durch eine Lösung von Kaliumbichromat von genau bekanntem Gehalt vollständig zu Kohlensäure und zu Wasser zu verbrennen und aus der Menge des auf diese Weise reduzierten Bichromats auf die vorhandene Kohlehydratmenge zu schließen. Die Oxydation des *Glycerins* erfolgt nach der Gleichung[1]:

$$3\,C_3H_8O_3 + 7\,K_2Cr_2O_7 + 28\,H_2SO_4 = 7\,K_2SO_4 + 7\,Cr_2(SO_4)_3 + 9\,CO_2 + 40\,H_2O,$$

und die der Hexosen nach der folgenden:

$$C_6H_{12}O_6 + 4\,K_2Cr_2O_7 + 16\,H_2SO_4 = 22\,H_2O + 6\,CO_2 + 4\,K_2SO_4 + 4\,Cr_2(SO_4)_3,$$

wie Herr *D. Laszló* auf unsere Veranlassung durch nachfolgende Versuche mit Glucose und Fructose festgestellt hat.

Die quantitative Bestimmbarkeit von *Dioxyaceton* wurde von uns mit Hilfe eines Präparats der Farbwerke vorm. Meister, Lucius und Brüning, Höchst a. M. (Oxanthin Höchst) sichergestellt. Die Oxydationsgleichung ist die obige, wenn man für 1 Mol Hexose 2 Mol Dioxyaceton setzt. Es ist demnach kaum daran zu zweifeln, daß die meisten Zuckerarten auf diese Weise quantitativ oxydierbar sind.

Um so auffallender ist die Resistenz, welche die Kohlehydratkomponente der Hexosediphosphorsäure gegen die Oxydation mit Kaliumdichromat zeigt. Wie die folgenden Zahlen zeigen, ist der Verbrauch an Kaliumbichromat ein viel geringerer als der theoretisch vorausberechneten Menge entsprechen würde. Worauf diese beispiellose Widerstandsfähigkeit beruht, konnten wir bis jetzt nicht ermitteln. Es liegt nahe, an *zyklische Strukturen* zu denken. Es ist nicht anzu-

---

[1]) *Hehner*, Journ. Soc. Chem. Ind. 1889, S. 4; *J. Marian*, diese Zeitschr. 150, 290, 1924.

nehmen, daß die Reaktion auf einer Zwischenstufe etwa bei der Zuckersäure stecken geblieben wäre, da diese durch das Oxydationsmittel auch wohl zerstört wird. Quantitative Versuche über diese Frage sind im Institut ebenfalls im Gange.

Nach obiger Gleichung entsprechen 180 g Hexose = 1176 g Kaliumbichromat oder, nachdem 1 Mol hexosediphosphorsaures Natrium theoretisch bei der Hydrolyse nach

$$C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2 + 2\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2\,Na_2HPO_4$$

aufgespalten wird, entsprechen auch 428 g hexosediphosphorsauren Natriums 1176 g Kaliumbichromat, d. h. man muß 65,33 g Kaliumbichromat im Liter lösen, um eine Maßflüssigkeit zu erhalten, von der 1 ccm = 0,01 g Hexose entsprechen.

Tabelle I.

	Glucose				Fructose			
	Konzentration Proz.	Menge nach *Bertrand*	Menge nach *Hehner*	Fehler Proz.	Konzentration Proz.	Menge nach *Bertrand*	Menge nach *Hehner*	Fehler Proz.
1.	4,64	0,0928	0,0938	1	1,98	0,0386	0,0409	5
2.	4,64	0,2320	0,2385	3	1,93	0,0386	0,0408	5
3.	7,72	0,0772	0,0718	4	9,65	0,1930	0,2046	5
4.	7,72	0,0772	0,0738	4	9,65	0,1930	0,2037	5
5.	19,30	0,1930	0,1838	4	19,30	0,1930	0,1940	1,5
6.	19,30	0,1930	0,1865	3				

Tabelle II.

Hexosediphosphorsaures Natrium.

Candiolin g	Glucose Berechn.	Glucose nach *Hehner*	Lösung ccm	Gefundene Glucose von der berechneten Menge Proz.
0,3659	0,1539	0,0347	10	22,6
0,3659	0,1539	0,0380	10	24,7
0,7318	0,3077	0,0739	20	24,0
0,7318	0,3077	0,0800	26	26,0
0,9147	0,3847	0,0945	26	24,6
			Mittel:	24,4

Die Versuche ergeben sonach, daß der Kaliumbichromatverbrauch nicht etwa, wie bei obiger Gleichung für die Oxydation von Dextrose und Lävulose theoretisch und praktisch entspricht, für 1 Mol $C_6H_{12}O_6$ = 4 Mol $K_2Cr_2O_7$ beträgt, vielmehr nur ein Viertel dieses Wertes, das ist für 1 Mol $C_6H_{12}O_6$ = 1 Mol $K_2Cr_2O_7$.

Außerdem wurde gezeigt, daß bei wechselndem Überschuß an Oxydationsmittel trotzdem immer ungefähr derselbe Endzustand erreicht wird.

Analyse des Dioxyacetons (Oxanthin Höchst).

Reduktion[1]) nach *Bertrand* berechnet als Glucose:

E_1 = 0,3520 g, in 100 ccm sind 0,3520 g
nach *Bertrand* gefunden 0,2500 g = 71,03 Proz.
E_2 = 0,9760 g, in 100 ccm sind 0,3904 g
nach *Bertrand* gefunden 0,2536 g = 67,01 „
E_3 = 1,1530 g, in 100 ccm sind 0,4612 g
nach *Bertrand* gefunden 0,8000 g = 69,38 „
E_4 = 2,2215 g, in 100 ccm sind 0,9091 g
nach *Bertrand* gefunden 1,5500 g = 69,79 „
E_5 = 5,0020 g, in 100 ccm sind 2,0004 g
nach *Bertrand* gefunden 3,6235 g = 72,47 „

Mittelwert in Prozenten der Theorie **69,94 Proz.**

danach ist F = 1,432 der Faktor, mit dem die nach *Bertrand* als Glucose gefundene Dioxyacetonmenge zu multiplizieren ist, um die tatsächlich vorhandene Menge zu finden.

Reduktion durch Titration nach Fehling.

E = 1,1530 g gelöst in 250 ccm Wasser.

1. 20 ccm *Fehling*scher Lösung verbrauchen von diesem 24,0 ccm
2. 20 ccm „ „ „ „ „ 24,0 „

In der Kälte nach 15 Minuten Stehen verbrauchen

3. 20 ccm . . . . 24,0 ccm

Von der *Fehling*schen Lösung entsprechen 20 ccm = 0,1 g Glucose, somit entsprechen 24,0 ccm der Lösung x 1,04 g Zucker auf 260 ccm umgerechnet, das sind **88,88** Proz. der Einwage.

E = 2,2215 g gelöst in 250 ccm H_2O.

1. 20 ccm Fehling verbrauchen von dieser Lösung 11,5 ccm
2. 20 „ „ „ „ „ „ 13,0 „
3. 20 „ „ „ „ „ „ 12,9 „
4. 20 „ „ „ „ „ „ 12,0 „

Im Mittel 12,35 ccm

In 250 ccm Lösung sind demnach enthalten 2,0243 g Zucker, das sind **91,39 Proz.** der Einwage.

E = 5,0020 g gelöst in 200 ccm Wasser.

In vier Parallelbestimmungen wurden im Mittel auf 250 ccm umgerechnet 4,5950 g Zucker, das sind **91,90 Proz.** der Einwage gefunden.

[1]) Den bisher vorliegenden Literaturangaben entsprechend, wäre das Reduktionsvermögen der Triosen (Glycerinaldehyd und Dioxyaceton) demjenigen der Glucose ähnlich. *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **18**, 316, 1908; *Wohl*, Berl. Ber. **31**, 1800, 1878; *O. Piloty*, ebendaselbst **30**, 3165, 1897.

Quantitative Bestimmung des Dioxyacetons durch Oxydation durch Kaliumbichromat.

$C_3H_6O_3 + 2\,K_2Cr_2O_7 + 8\,H_2SO_4 = 11\,H_2O + 3\,CO_2 + 2\,K_2SO_4 + 2\,Cr_2(SO_4)_3$; für $90\,C_3H_6O_3 = 588{,}4\,K_2Cr_2O_7$ oder 0,01 g Dioxyaceton = 0,06538 g Kaliumbichromat.

E = 0,9455 g, gelöst in 50 ccm Wasser, davon je 10 ccm enthaltend 0,1891 g, nach *Hehner* gefunden 0,1870 g, also in 50 ccm = 0,9350 g, entsprechend = 98,88 Proz. Unseren Erfahrungen gemäß ergibt also die Oxydation mit Kaliumbichromat für das Dioxyaceton den theoretischen Zuckerwert.

Titrationsacidität des Candiolinnatriums gegen Phenolphthalein.

In a) verbrauchten 25 ccm der Lösung x, enthaltend 0,2438 g Substanz, 1,55 ccm n/10 Lauge.

b) verbrauchten 25 ccm der Lösung x, enthaltend 0,2438 g Substanz, 1,60 ccm n/10 Lauge.

Die Substanz zeigte also minimale Acidität.

Gärung.

Die Vergärbarkeit des Präparats wurde mit käuflicher Preßhefe (Spiritus- und Preßhefefabrik Stadlau) untersucht. Die *Buchner*schen Gärröhrchen wurden wie folgt gefüllt:

a) 10 ccm Lösung x + 1 ccm Hefesuspension ohne Zusatz von Toluol oder Chloroform, 48 Stunden bei 36° C belassen, zeigen minimale Vergärung = 0,5 ccm CO_2.

b) 10 ccm Leitungswasser + 1 ccm derselben Hefesuspension ebenso behandelt, Gärung = 0.

c) 10 ccm 1proz. Dextroselösung vergären normal unter starker Kohlensäureentwicklung.

Anhang. **Analyse des sauren Candiolinnatriums.**

Ursprünglich hatten wir saures Candiolinnatrium von der Firma Bayer & Co. zur Verfügung, das ungefähr der Formel $C_6H_{10}O_4(PO_4NaH)_2$ = 384 entsprach.

Für physiologische Versuche neutralisierten wir die Lösung des Präparats mit Natronlauge. Für die Stoffwechselversuche aber haben wir wegen bequemerer Handhabung die scheinbar physiologischere Substanz, das neutrale Candiolinnatrium, verwendet.

Untenstehend geben wir einige Daten der Analyse des sauren Candiolinnatriums; es wurde genau so verfahren wie bei der Analyse des anderen Präparats.

Wassergehalt.

Aus dem Gewichtsverlust beim Trocknen 4,45 Proz.

Reduktion nach Bertrand.

In 100 ccm Wasser wurden 1,015 g der getrockneten Substanz gelöst:

a) 20 ccm dieser Lösung zeigten nach *Bertrand* als Dextrose . . . . 0,039 g Zucker

b) 20 ccm dieser Lösung zeigten nach *Bertrand* als Dextrose . . . . 0,039 g „

das sind für 100 ccm der Lösung . . . . . 0,195 g „

statt der theoretisch erwarteten Menge von 0,476 g „

Reduktion nach Hydrolyse.

In a) 20 ccm Lösung *y* nach 1 ½ Stunden Hydrolyse gefunden als Dextrose . . . . 0,051 g Zucker

b) 20 ccm Lösung *y* nach 1 ½ Stunden Hydrolyse gefunden als Dextrose . . . . 0,051 g „

das sind für 100 ccm Lösung *y* . . . . . 0,255 g „

Bei vierstündiger Hydrolyse wurden gefunden 100 ccm Lösung *y* 0,220 g, wobei sich Gelb- bis Braunfärbung und Huminsubstanzbildung zeigte. Es hat sich also, als Glucose berechnet, statt der von der Formel theoretisch berechneten Zuckermenge von 0,476 g nur etwa die Hälfte vorgefunden.

Phosphorsäurebestimmung

wurde wie früher angeführt:

a) 20 ccm Lösung *y* enthaltend. . . . . . . 0,0697 g P_2O_5

b) 20 „ „ *y* „ . . . . 0,0702 g P_2O_5

Mittel . . . 0,070 g P_2O_5

in 100 ccm der Lösung *y* also gefunden . . 0,350 g P_2O_5

statt der theoretisch erwarteten Menge von . 0,384 g P_2O_5

Natriumbestimmung.

Zur Bestimmung wurden 2,526 g Substanz nach *Neumann* mit Säure gemischt, verascht und in einer *Berliner* Porzellanschale abgeraucht. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die Phosphorsäure mit Chlorbarium entfernt, mit Barytwasser stark alkalisch gemacht, filtriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit Ammoniak und Ammoncarbonat von Bariumionen befreit, am Wasserbad eingedampft, die Ammonsalze in der Platinschale abgeraucht und schwach geglüht und als Natriumchlorid gewogen und berechnet.

Die Einwage 2,526 g wasserfreie Substanz enthalten theoretisch 0,3062 g Natrium, gefunden wurden 0,2741 g Natrium.

Gärung.

Wie früher. Es konnte in keinem Falle weder die ursprünglich saure noch die sorgfältig neutralisierte Lösung der Substanz vergoren werden.

Titrationsacidität gegen Phenolphthalein.

10 ccm der Lösung *y* enthalten 0,1015 g saures hexosediphosphorsaures Natrium; dieser Menge würde theoretisch nach der Gleichung

$$C_6H_{10}O_4(PO_4NaH)_2 + 2\,NaOH = C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2 + 2\,H_2O$$

eine Menge von 0,0312 g NaOH entsprechen. Gefunden wurden in a) 0,0202 g NaOH, in b) 0,0200 g NaOH[1]).

III. Physiologischer Teil.

A. Stoffwechselversuch an einem eiweiß- und phosphorarm ernährten Hunde. Spaltung parenteral beigebrachter Kohlehydratphosphorsäure im Organismus.

1. Ernährung.

Der im Beginn des Versuchs 18,6 kg schwere Hund (rauhhaariger Terrier) wird im Stoffwechselkäfig ausschließlich mit Zucker und Fett ernährt. Bei Abschätzung des Nahrungsbedürfnisses mit etwa 50 cal pro Kilogramm wären etwa 930 cal pro Tag erforderlich. Die normale Ernährung betrug pro Tag:

80 g Rohrzucker, à 3,9 cal	312 cal
80 g Speck[2])	520 „
Summe . .	882 cal

Der Kalorienbedarf des Hundes war also nahezu gedeckt.

Im Verlauf des Versuchs hatte das Gewicht des Hundes von 18,6 kg auf 17,0 kg abgenommen. In der ersten Woche des Versuchs erfolgte ein Gewichtssturz von 18,6 auf 17,1 kg. In den zwei letzten Wochen des Versuchs hatte der Hund tatsächlich nicht mehr an Gewicht abgenommen.

Die in einem halben Liter Wasser gelöste Zuckermenge von 80 g wurde aus einer Futterschale mit überhängenden Rändern, die ein Verspritzen unmöglich machten, willig und meist gierig aufgenommen. Die Speckration von 80 g wurde vollständig gefressen. Am 5. Versuchstage wurde dem Hunde aus Versehen die doppelte Futterration gereicht, worauf derselbe mit vorübergehender alimentärer Glykosurie reagierte. Am 20. und 21. Versuchstage wurde die Aufnahme des Zuckerwassers verweigert, worauf der Versuch abgebrochen wurde.

---

[1]) *Anmerkung.* Tatsächlich schlägt Phosphorsäure bei Titration gegen Phenolphthalein aber nicht erst um, wenn Na_3PO_4 gebildet ist, sondern es verhält sich (vgl. *Treadwell*, 10. Aufl., S. 506) NaH_2PO_4 bereits sauer, Na_2HPO_4 aber nur mehr ganz schwach alkalisch gegen Phenolphthalein.

Falls sich also die an die Hexose gebundene Phosphorsäure ebenso verhält, würde bereits Neutralität erreicht werden, wenn etwa auf 1 Mol $C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2$ nicht 2 Mol NaOH, sondern 1 Mol NaOH zugesetzt werden. Demnach würde die theoretisch geforderte Menge NaOH nicht 0,0312 bedeuten, sondern 0,0156.

[2]) Nach *Atwater* und *Bryant* (zitiert nach *Graham-Lusk*, Ernährung und Stoffwechsel, deutsch von *Hess* 1910, S. 338) Brennwert pro amerikanisches Pfund 454 g = 2950 cal, also für 100 g = 649 cal.

2. Verhalten des Versuchstieres.

Der Hund verhielt sich, nachdem er sich an den Käfig gewöhnt hatte, im ganzen ruhig, ohne Zeichen besonderer Schwäche oder Depressionen.

Erst am letzten und vorletzten Tage der 21tägigen Versuchsperiode machte er einen etwas benommenen Eindruck.

Die Rektaltemperatur zeigte keine auffällige Abnahme und schwankte zwischen 37,6 und 38,2° C.

Trotz ausschließlicher Zucker- und Speckernährung fand sich in dem täglich daraufhin untersuchten Harn kein Aceton.

Zucker war nur am 5. Versuchstage vorübergehend vorhanden, nachdem durch Versehen die doppelte Zuckermenge von 160 g gereicht worden war.

3. Harn und Stuhl.

Die Harnmenge schwankte zwischen 200 und 400 ccm am Tage, im Mittel 310 ccm, gegenüber einer Flüssigkeitsaufnahme von 500 ccm.

Eine Stuhlentleerung am 2. Tage betrug getrocknet 25 g, die nächste Stuhlentleerung erfolgte erst am 8. Tage mit 10 g Trockengewicht. Weitere Mengen des sehr spärlichen Stuhles konnten nicht gesammelt werden, da sie vom Hunde sofort gefressen wurden.

Der Kot vom 8. Tage enthielt in seiner Gesamtmenge 0,144 g P_2O_5 und 0,512 g Stickstoff.

4. Parenterale Darreichung von neutralen hexosediphosphorsaurem Natrium.

Das hexosediphosphorsaure Natrium (neutrales Candiolin-Natrium Bayer & Co.) wurde in 5proz., durch kurzes Aufkochen sterilisierter Lösung dem Hunde subkutan mit Hilfe einer großen Injektionsspritze verabreicht. Die Injektionsstellen wurden chemisch enthaart und mit Jodtinktur desinfiziert. Die Injektionen wurden ohne jede Schmerzensäußerung vertragen, trotzdem es sich scheinbar um eine stark hypertonische Lösung gehandelt hat[1]).

Es wurden zwei Injektionen ausgeführt:

a) Am 14. Versuchstag *67 ccm* hexosediphosphorsaures Natrium in 5proz. Lösung, theoretisch enthaltend *3,35 g Candiolinnatrium*, und da *1 g Candiolinnatrium 0,332 g* P_2O_5 *enthält, entsprechend 1,112 g* P_2O_5.

b) Am 18. Versuchstag *100 ccm 5proz. Candiolinnatriumlösung, enthaltend 1,660 g* P_2O_5.

---

[1]) Nach *Euler* und *Fodor*, diese Zeitschr. 84, S. 4, wäre das Kalisalz des Hexosephosphorsäureesters zu etwa 80 Proz. dissoziiert; die Molekulargewichtsbestimmung ergab aber nur etwa 240, das ist etwa die Hälfte des theoretischen Wertes für $C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2 = 428$.

Tabelle

A. Stoffwechselversuch an einem eiweiß- und phosphorarm
Hexosediphosphorsäure

Datum	Tag	Harn-Vol. ccm	Gesamt-P_2O_5 pro Tag	P_2O_5 Mittel von 1 Tage	Ausscheidungs-Mittel von 2 Tagen	Inj
11. XI.	1.	550	0,557 0,579	0,568		
12. XI.	2.	515	0,921 0,947	0,933		
					0,675	
13. XI.	3.	225	0,416 0,416	0,416		
14. XI.	4.	225	0,296 0,320	0,308		
					0,930	•
15. XI.	5.	600	1,560 1,542	1,551		
16. XI.	6.	375	0,883	0,883		
					0,575	
17. XI.	7.	180	0,267	0,267		
18. XI.	8.	385	0,747	0,747		
					0,530	
19. XI.	9.	180	0,313	0,313		
20. XI.	10.	300	0,347 0,321 0,350	0,327		
					0,499	
21. XI.	11.	270	0,671	0,671		
22. XI.	12.	365	0,320	0,320		
					0,320	
23. XI.	13.	365	0,320	0,320		
24. XI.	14.	175	0,954 0,924	0,938		67
					0,598	= er
25. XI.	15.	300	0,261 0,258	0,259		1,112
26. XI.	16.	300	0,490 0,540	0,515		
					0,474	
27. XI.	17.	285	0,434 0,434	0,434		
28. XI.	18.	210	1,342 1,369 1,390	1,369		
					1,118	10
29. XI.	19.	420	0,844 0,892	0,868		= er
30. XI.	20.	110	0,281 0,281	0,281		1,66
					0,288	
1. XII.	21.	110	0,292 0,298	0,295		

III.

ernährten Hunde, Phosphatausscheidung, Spaltung der im Organismus.

Gesamt-N pro Tag	Ausscheidungs-Mittel von 1 Tage	Ausscheidungs-Mittel von 2 Tagen	Futtermenge	Gewicht kg	Anmerkungen
3,322	3,322	2,79	Am 1. u. 2. Tage je 80 g Zucker, 50 g Speck, 500 g H_2O	18,6	
2,274	2,274		Am 3. u. 4. Tage je 80 g Zucker, 80 g Speck, 500 g H_2O		
2,343	2,343				
2,343		2,87			
3,393	3,393		150 g Zucker, 160 g Speck, 1000 g H_2O		Alimentäre Glykosurie
3,393					
3,382	3,382	2,85			
2,318	2,318		Vom 6. bis 13. Tage je 80 g Zucker, 80 g Speck, 500 g H_2O	17,1	
2,318					
4,070	4,070				
4,070		2,79			
1,404	1,404			17,0	
1,404					
1,941	1,941				
1,941					
3,602		2,77			
3,602	3,602				
2,110	2,110				
2,110	2,110	2,11			
3,260	3,260		80 g Zucker, 80 g Speck, 430 g H_2O		Keine alimentäre Glykosurie
		2,89			
2,520	2,520				
2,520					
1,638	1,638		Vom 15. bis 17. Tage je 80 g Zucker, 80 g Speck, 500 g H_2O		
1,638		2,27			
2,921	2,912				Keine Acetonurie
2,904					
2,058	2,058		80 g Zucker, 80 g Speck, 400 g H_2O	17,0	Keine alimentäre Glykosurie
2,058		2,43			
2,780	2,800		Am 20. u. 21. Tage je 216 g Zucker, 80 g Speck, 850 g H_2O		Keine Acentonurie
2,820					
2,350	2,363				
2,377		2,65			
2,926	2,926			17,0	
2,926					

5. Stickstoffausscheidung im Harn.

Die Stickstoffausscheidung im Harn nach *Kjeldahl* in je 5 ccm Harn, meist mit Doppelbestimmungen ermittelt, betrug

am 2. und 3. Versuchstage die Stickstoffausscheidung pro Tag		2,79 g
„ 4. „ 5. „ „ „ „ „		2,87 g
„ 6. „ 7. „ „ „ „ „		2,85 g
„ 8. „ 9. „ „ „ „ „		2,79 g
„ 10. „ 11. „ „ „ „ „		2,77 g
„ 12. „ 13. „ „ „ „ „		2,11 g
	Mittel der ganzen Periode	**2,66 g**

Injektion von 3,35 g Candiolinnatrium.

14. und 15. Versuchstag Stickstoffausscheidung pro Tag		2,89 g
16. „ 17. „ „ „ „		2,27 g
	Mittel . . .	**2,58 g**

Injektion von 5,00 g Candiolinnatrium.

18. und 19. Versuchstag Stickstoffausscheidung pro Tag		2,43 g
20. „ 21. „ „ „ „		2,65 g
	Mittel . . .	**2,54 g**
	Mittel der ganzen Versuchsperiode . . .	**2,64 g**

Die Nahrung war nicht ganz stickstofffrei, insofern der Speck 0,42 Proz. Stickstoff enthielt. Die täglich dargereichten 80 g Speck enthielten sonach 0,336 g Stickstoff.

Die tägliche Mehrausscheidung an Stickstoff betrug sonach

2,64 g N pro Tag
— 0,34 g N „ „
2,30 g N pro Tag

Die Stickstoffausscheidung ist also sehr regelmäßig und auch durch die beiden Candiolininjektionen *weder im Sinne einer Stickstoffretention noch im Sinne einer auf erhöhten Eiweißzerfall hindeutenden Mehrausscheidung von Stickstoff* merklich beeinflußt worden.

6. Phosphorsäureausscheidung.

Die Phosphorsäureausscheidung wurde, um möglichst große Genauigkeit zu erzielen, nicht durch einfache maßanalytische Bestimmung ermittelt, vielmehr wurde stets die *Neumann*sche Säureveraschung angewendet, wobei meistens Doppelbestimmungen ausgeführt worden sind.

Einigemal wurde auch die organische Phosphorsäure nach dem kolorimetrischen Verfahren von *Bell-Doisy*[1]) bestimmt.

Für unsere Fragestellung war die Feststellung der Ermittlung *der Relation* N/P_2O_5 *von größter Bedeutung.*

[1]) *Bell-Doisy*, Journ. of physiol. Chem. 44, 55, 1920.

Dieselbe kann für Muskeln sowie für die Zusammensetzung eiweißhaltiger tierischer Gewebe mit 6,6 bewertet werden, derart, daß, wie aus den Berechnungen von *F. G. Benedict*[1]) einerseits und den von *Th. Brugsch*[2]) andererseits auf Grund der vorliegenden Organanalysen hervorgeht, die im Hungerzustande bzw. bei stickstofffreier Ernährung im Harn auftretende Stickstoff- und Phosphormenge einen Rückschluß auf die Desintegration der Gewebe gestattet. Die effektive Mehrausscheidung von Phosphorsäure, die man bei Hungerversuchen zu beobachten pflegt, wird derart gedeutet, daß eine Ausschwemmung von Phosphorsäure aus den Knochen stattfindet. Unter Zugrundelegung dieser *Relation* $N/P_2O_5 = 6{,}6$ würde die durch Protoplasmazerfall im Organismus bedingte Menge ausgeschiedener P_2O_5, da die durchschnittliche Stickstoffausscheidung während der ganzen Versuchsperiode nach Abzug des Nahrungsstickstoffs in unseren Versuchen mit 2,3 g zu bewerten ist, *zu* $\frac{2{,}30}{6{,}60} = 0{,}348$ *pro Tag bemessen.*

Schon 2 bis 3 Tage vor dem als 1. Versuchstag bezeichneten Tage war der Hund phosphor- und eiweißarm mit Zucker und Speck gefüttert worden. Die Reste der vorausgegangenen phosphorreichen Ernährung sind offenbar nur langsam ausgeschwemmt worden und zeigte dementsprechend die beobachtete Phosphorsäureausscheidung im Harn eine *fallende Tendenz*.

Die P_2O_5-Ausscheidung betrug

am 2. und 3. Versuchstage	. . . . .	pro Tag	0,675 g P_2O_5
„ 6. „ 7. „	. . . . .	„ „	0,575 g P_2O_5
„ 8. „ 9. „	. . . . .	„ „	0,530 g P_2O_5
„ 10. „ 11. „	. . . . .	„ „	0,499 g P_2O_5
„ 12. „ 13. „	. . . . .	„ „	0,320 g P_2O_5

sodann nach Abklingen der durch die beiden Hexosephosphatinjektionen bedingten Mehrausscheidung

am 20. und 21. Versuchstage . . . . . pro Tag 0,288 g P_2O_5

Wir können die Phosphorsäureausscheidung[3]) in *zwei Fraktionen* aufteilen:

a) den dem Zerfall von Muskelgewebe und anderer protoplasmareicher Organe entstammenden Anteil, den wir oben mit 0,348 g P_2O_5 pro Tag bewertet haben (**„Protoplasma-P_2O_5“**),

b) den Rest von P_2O_5 (**„Extra-P_2O_5“**).

[1]) *F. G. Benedict*, A study of prolonged starvation Washington, Published by the Carnegie Inst. 1915, S. 273 bis 277.

[2]) *Th. Brugsch*, Der Hungerstoffwechsel, Oppenheimers Handb. 4, I, 303, 1901.

[3]) Der minimale Phosphatidgehalt des Speckes fällt in bezug auf seinen Phosphorgehalt wie mehrere Kontrollbestimmungen mit Hilfe des Säureveraschungsverfahrens ergeben haben, völlig in die Versuchsfehlergrenzen.

Wenn wir nun die Beobachtungen über Phosphorsäureausscheidung in eine Vorperiode und zwei Injektionsperioden gruppieren, so ergibt sich uns folgendes Bild:

Vorperiode.

6. und 7. Versuchstag	0,575 g P_2O_5
8. „ 9. „	0,530 g P_2O_5
10. „ 11. „	0,499 g P_2O_5
12. „ 13. „	0,320 g P_2O_5
Mittel	0,481 g P_2O_5

= 0,348 g *Protoplasma-P_2O_5* + 0,133 g *Extra-P_2O_5* im Tag.

1. Injektionsperiode.

14. Versuchstag	0,938 g P_2O_5
15. „	0,259 g P_2O_5
16. „	0,515 g P_2O_5
17. „	0,434 g P_2O_5
Mittel	0,536 g P_2O_5

= 0,348 g *Protoplasma-P_2O_5* + 0,188 g *Extra-P_2O_5* pro Tag.

2. Injektionsperiode.

18. Versuchstag	1,369 g P_2O_5
19. „	0,868 g P_2O_5
20. „	0,281 g P_2O_5
21. „	0,295 g P_2O_5
Mittel	0,703 g P_2O_5

= 0,348 g *Protoplasma-P_2O_5* + 0,355 g *Extra-P_2O_5* pro Tag.

7. Phosphorretention.

In der ersten viertägigen Injektionsperiode waren 1,112 g P_2O_5 als Candiolinnatrium injiziert worden. Dieses Extraquantum von P_2O_5 auf 4 Tage verteilt, würde pro Tag ein Plus an „Extra-P_2O_5“ von 1,112 : 4 = 0,278 g P_2O_5 bedeuten. Statt dessen sind als „Extra-P_2O_5“ während der ersten viertägigen Injektionsperiode 0,188 g P_2O_5 zum Vorschein gekommen.

Wäre keine Retention erfolgt, so hätten sich also zu den 0,133 g „Extra-P_2O_5“ der Vorperiode noch 0,278 g P_2O_5 täglich, von injizierter Hexosediphosphorsäure herstammend, dazu addieren müssen. Das Extra-P_2O_5 hätte also 0,133 + 0,278 = 0,411 g P_2O_5 pro Tag von Rechts wegen betragen sollen. Da es aber tatsächlich nur 0,188 g pro Tag betragen hat, ergibt sich daraus eine *Retention von 0,411 — 0,188 = 0,223 g P_2O_5* für jeden Tag der ersten viertägigen Injektionsperiode. Für die erste ganze viertägige Injektionsperiode demnach eine *Retention von 4 × 0,223 = 0,892 g P_2O_5*.

Es ergibt sich sonach nach dieser Rechnungsart eine Retention von 0,892 g P_2O_5 von den in Form von hexosediphosphorsaurem Natrium injizierten 1,112 g P_2O_5, was **80 Proz.** der injizierten Menge bedeutet.

In der zweiten viertägigen Injektionsperiode waren 1,660 g P_2O_5 in Form von Candiolinnatrium injiziert worden. Dieses Extraquantum, auf 4 Tage verteilt, würde ein Plus an Extra-P_2O_5 von 1,660 : 4 = 0,415 g P_2O_5 täglich bedeuten.

Wäre keine Retention erfolgt, so hätten sich demnach den 0,133 g Extra-P_2O_5 der Vorperiode täglich noch 0,415 g P_2O_5, von injiziertem Candiolinnatrium herrührend, dazu addieren müssen.

Das Extra-P_2O_5 hatte also von Rechts wegen 0,133 + 0,415 = 0,548 g P_2O_5 betragen sollen; da es aber tatsächlich nur 0,355 g P_2O_5 täglich betragen hat, ergibt sich eine *Retention von 0,548 — 0,355 gleich 0,193 g* P_2O_5 täglich, also für die ganze zweite viertägige Injektionsperiode eine *Retention von* $4 \times 0{,}193 = 0{,}772$ *g* P_2O_5, d. h. **46 Proz.** von der injizierten Menge von 1,660.

Zur *Kontrolle* wurde die P_2O_5-Retention auch auf eine andere Art noch berechnet:

Die gesamte im Laufe von 20 Versuchstagen eliminierte *Stickstoffmenge betrug 52,746 g N.*

Die gesamte im Laufe von 20 Versuchstagen eliminierte P_2O_5-Menge hat 11,065 g P_2O_5 betragen. Einer durch Protoplasmazerfall bedingten Stickstoffausscheidung von 52,746 g würde nach der *Benedictschen Relation* eine P_2O_5-Ausscheidung von $\frac{52{,}746}{6{,}6} = 7{,}992$ g P_2O_5 entsprechen. Es verbleibt also ein Extra-P_2O_5 von

11,065 g P_2O_5
7,992 g P_2O_5
3,073 g P_2O_5

Da durch zwei Candiolinnatriuminjektionen

	1,112 g P_2O_5
	1,660 g P_2O_5
insgesamt	2,772 g P_2O_5

eingeführt worden sind, würde sich aus einem Extra-P_2O_5 der Vorperiode von 0,133 g täglich für 20 Versuchstage

2,666 g P_2O_5
2,772 g P_2O_5
5,438 g P_2O_5

als zu erwartendes Extra-P_2O_5 ergeben.

Tatsächlich wurde aber nur ein Extra-P_2O_5 von 3,073 g P_2O_5 beobachtet. Es würde sich daraus also eine Retention von

$$\begin{array}{r} 5{,}438 \text{ g } P_2O_5 \\ 3{,}073 \text{ g } P_2O_5 \\ \hline 2{,}365 \text{ g } P_2O_5 \end{array}$$

ergeben. Die frühere Berechnungsart hat eine Retention von

$$\begin{array}{rl} & 0{,}892 \text{ g } P_2O_5 = 1.\ \text{Injektion} \\ & 0{,}772 \text{ g } P_2O_5 = 2.\quad\ " \\ \hline \text{insgesamt} & 1{,}664 \text{ g } P_2O_5 \text{ ergeben.} \end{array}$$

Die P_2O_5-Retention kann also in diesem Versuch mit rund 2 g P_2O_5 nach Einführung von 2,7 g P_2O_5 bewertet werden, was etwa vier Fünftel der als Candiolinnatrium eingeführten P_2O_5-Menge entspricht.

B. *Stoffwechselparallelversuch zu A.*

1. Ernährung.

Junge Hündin zu Beginn des Versuchs 3,9 kg schwer. Es wurde versucht, auch in diesem Falle die Ernährung mit Zucker und Speck durchzuführen; doch bereits am 5. Tage verweigerte der Hund die Nahrungsaufnahme und es trat Erbrechen und Durchfall ein. Es wurde daher vom 9. Tage an vollständige Karrenz durchgeführt, wobei das Tier Wasser ad libitum erhielt. In der Zeit vcm 7. bis 10. Tage war die Nahrungsaufnahme eine minimale gewesen, insofern das Tier nur 10 g Speck und 5 g Zucker aufgenommen hat. Der Versuch kann also tatsächlich fast als Hungerversuch gelten.

2. Verhalten des Versuchstieres.

Der Hund verhielt sich im ganzen sehr ruhig. Am 15. Versuchstage stellte sich plötzlich hochgradige Schwäche ein, derart, daß das Tier sich nicht mehr auf den Beinen halten konnte und der Versuch abgebrochen werden mußte. Der Hund erholte sich nach Verabreichung von Milch und Brot sehr rasch und vertrug nach einigen Stunden eine Fleischmahlzeit.

Er hatte seit Beginn des Versuchs von 3,9 auf 2,5 kg abgenommen, also um mehr als ein Drittel seines Körpergewichts.

3. Harn und Stuhl.

Die Harnmenge variierte zwischen 25 und 130 ccm. Mittel der Vorperiode 92 ccm täglich. Nach der ersten Candiolininjektion 57 ccm, nach der zweiten Injektion 50 ccm, also jedenfalls keine Steigerung der Diurese im Anschluß an die Injektionen.

Nachdem der Kot während der ersten Versuchstage äußerst spärlich gewesen war, konnte während der Hungerperiode überhaupt kein Kot mehr aufgesammelt werden.

B. Parallelstoffwechselversuch zu A. Junger Hund, Phosphatausscheidung, Spaltung der Hexosediphosphorsäure.

Datum	Tag	Harn-Vol. ccm	Gesamt-P_2O_5 im Harn	Mittel von 2 Tagen	Subkutane Injektion	Futtermenge	Gesamt-N im Harn	Mittel von 2 Tagen	Gewicht kg	Anmerkungen
3. XII.	1.	85	0,211 0,214	0,189		20 g Zucker, 20 g Speck, 100 g Wasser	0,840 0,848	0,634	3,9	Keine Glykosurie
4. XII.	2.	25	0,172 0,160			Vom 2. bis 4. Tage je 20 g Zucker, 40 g Speck, 200 g Wasser	0,440 0,410			Keine Acetonurie (2.–8. Tag)
5. XII.	3.	88	0,215	0,211			0,730 0,774	0,594		
6. XII.	4.	60	0,208				0,436			
7. XII.	5.	110	0,237 0,259	0,182		Vom 5. bis 8. Tage je 10 g Speck, 5 g Zucker, 250 ccm Wasser	0,550	0,793		
8. XII.	6.	130	0,111 0,121				1,037			
9. XII.	7.	125	0,121 0,130	0,247			0,852 0,830	0,894		
10. XII.	8.	115	0,325 0,318				0,904 0,994		3,0	
11. XII.	9.	47	0,630 0,623	0,477	50 ccm = 2,5 g = 0,83 g P_2O_5	Vom 9. bis 15. Tage Wasser ad libitum sonst vollständige Karenz	1,484 1,613	1,707		Keine Glykosurie
12. XII.	10.	55	0,330 0,327				1,848 1,886			Keine Acetonurie (10.–12. Tag)
13. XII.	11.	95	0,640 0,674	0,440			3,026 3,026	1,984	2,7	
14. XII.	12.	32	0,224 0,224				0,941			
15. XII.	13.	60	0,752 0,756	0,698	25 ccm = 2,5 g = 0,83 g P_2O_5		1,587 1,596	1,707		Keine Glykosurie
16. XII.	14.	50	0,437 0,447				1,799 1,848			Keine Acetonurie (14.–15. Tag)
17. XII.	15.	38	0,308 0,308	0,308			1,566 1,503	1,559	2,5	

4. Parenterale Darreichung von neutralem hexosediphosphorsaurem Natrium.

Die Injektionen wurden unter aseptischen Kautelen in ähnlicher Weise wie im ersten Versuch ausgeführt.

Die erste Injektion am neunten Versuchstage betrug 50 ccm einer 5proz. Lösung von Candiolinnatrium, enthaltend 2,5 g Substanz, entsprechend 0,830 g P_2O_5.

Die zweite Injektion betrug 25 ccm einer 10proz. Lösung von Candiolinnatrium, enthaltend 2,5 g Substanz, entsprechend 0,830 g P_2O_5.

Die Injektionen erzeugten auch in diesem Falle keinerlei Schmerzäußerungen und hatten keine lokalen Reizwirkungen zur Folge. Die Resorption, an der Abnahme der fluktuierenden Schwellung unter der Haut kenntlich, erfolgte auch diesmal auffallend rasch im Verlauf von weniger als 2 Stunden.

Der Harn enthielt niemals weder Zucker noch Aceton.

5. Stickstoffausscheidung im Harn.

Es wurden meist Doppelbestimmungen nach *Kjeldahl* mit dem filtrierten Harn ausgeführt; ein etwa im Harn auftretendes Sediment wurde vor der Analyse stets durch Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Salzsäure in Lösung gebracht.

Auffallend war hier im Anschluß an die erste Injektion, trotz Absinkens der Harnmenge auf die Hälfte, ein bedeutender Anstieg der Stickstoffausscheidung von 0,894 g täglich am 7. und 8. Versuchstage, auf 1,707 g täglich am 9. und 10. Versuchstage. Es ist dies offenbar auf einen erhöhten toxischen Eiweißzerfall zurückzuführen, da die dargereichte Dosis diesmal pro Kilogramm Körpergewicht eine viel größere war.

Der Harnstickstoff hielt sich von da an andauernd auf einem hohen Niveau und betrug

am 10.	und	11.	Versuchstage	1,707 g N	täglich
„ 12.	„	13.	„	1,984 g N	„
„ 14.	„	15.	„	1,707 g N	„
„ 16.	„	17.	„	1,559 g N	„

6. Phosphorsäureausscheidung.

Die *Relation* N/P_2O_5 betrug

am 1.	und	2.	Versuchstage	3,35
„ 3.	„	4.	„	2,81
„ 5.	„	6.	„	4,36
„ 7.	„	8.	„	3,62
			Mittel der Vorperiode	3,53 pro Tag

Nach der ersten Injektion von hexosediphosphorsaurem Natrium betrug die Relation

am 9. und 10. Versuchstage	3,59
„ 11. „ 12. „	4,50

Nach der zweiten Injektion von hexosediphosphorsaurem Natrium

am 13. und 14. Versuchstage	2,51
„ 15. „	5,06

Wir haben wiederum die dem Eiweißzerfall entsprechende P_2O_5-Menge nach der Relation N/6,6 berechnet und die Gesamt-P_2O_5-Ausscheidung wieder auf die zwei Komponenten „**Protoplasma-P_2O_5**“ und „**Extra-P_2O_5**“ aufgeteilt:

	N/6,6 = Protoplasma-P_2O_5	Extra P_2O_5
1. und 2. Versuchstag	0,096	0,093
3. „ 4. „	0,090	0,121
5. „ 6. „	0,120	0,062
7. „ 8. „	0,136	0,111
Mittel	0,110	0,097 pro Tag

Nach der ersten Injektion von 0,830 g P_2O_5 in Form von Candiolinnatrium

am 9. und 10. Versuchstage	0,259	0,218
„ 11. 12. „	0,300	0,140
Mittel	0,280	0,179 pro Tag

Nach der zweiten Injektion von 0,830 g P_2O_5 in Form von Candiolinnatrium

	Protoplasma-P_2O_5	Extra-P_2O_5
am 13. und 14. Versuchstage	0,259	0,439
„ 15 „	0,236	0,064

7. Phosphorretention.

An vier Versuchstagen (9., 10., 11., 12.) *nach der ersten Injektion* von 0,830 g P_2O_5 in Form von Candiolinnatrium haben wir im ganzen eine Extra-P_2O_5-Ausscheidung von

am 9. und 10. Versuchstage	2 × 0,218 = 0,436 g P_2O_5
„ 11. „ 12. „	2 × 0,140 = 0,280 g P_2O_5
insgesamt	0,716 g P_2O_5

beobachtet.

Auch ohne Hexosephosphorsäureinjektion wäre eine Ausscheidung von 0,097 × 4 = 0,388 g P_2O_5 zu erwarten gewesen. Es resultierte also auf Rechnung des Candiolinnatriums nur ein Mehrbetrag von 0,716 – 0,388 = 0,328 g P_2O_5.

Demnach Retention

$$\begin{array}{r} 0{,}83\ \text{g} \\ -\,0{,}33\ \text{g} \\ \hline \mathit{0{,}50}\ \text{g}\ P_2O_5 \end{array}$$

was einer Retention von **63 Proz.** entspricht.

Nach der zweiten Injektion von 0,830 g P_2O_5 in Form von Candiolinnatrium haben wir eine Extra-P_2O_5-Ausscheidung von

am 13. und 14. Versuchstage	2 × 0,439 =	0,878 g P_2O_5
„ 15. „	0,064 =	0,064 g P_2O_5
in 3 Tagen also insgesamt		0,942 g P_2O_5

beobachtet.

Aus der Vorperiode berechnet sich für drei Versuchstage als Extra-P_2O_5 3 × 0,097 = 0,291 g P_2O_5; es verbleibt also auf Rechnung des injizierten Candiolinnatriums 0,942 − 0,291 = 0,651 g P_2O_5.

Sonach injizierte Menge	0,830 g P_2O_5
Beobachtete Mehrausscheidung . .	0,651 g P_2O_5
Retention	*0,179 g* P_2O_5, das sind **22 Proz.**

Wir haben also hier im Hungerversuch nach der ersten Injektion eine Retention von 63 Proz., eine solche von nur 22 Proz. nach der zweiten Injektion. Im vorigen Versuch bei Zucker-Speckfütterung waren nach der ersten Injektion von Candiolinnatrium etwa 80 Proz., nach der zweiten Injektion etwa 46 Proz. retiniert worden.

C. Stoffwechselversuch am phlorrhizindiabetischen Hunde zur Prüfung der Glykoneogenie aus hexosediphosphorsaurem Natrium.

Ein Hund von 9,3 kg Gewicht erhielt nach vorausgegangenem zweitägigen Hungern zum Zwecke der Einleitung einer Phlorrhizinglykosurie bei vollständiger Karenz nach der Methode von *Graham-Lusk* eine tägliche Injektion von 1 g „Phlorrhizin *Merck*“ suspendiert in 7,0 ccm Olivenöl subkutan.

Wasser wurde während des ganzen Versuchs ad libitum gegeben (Tabelle V).

Die *Harnausscheidung* war dementsprechend eine reichliche. Zucker wurde nach *Bertrand*, Stickstoff nach *Kjeldahl* täglich durch Doppelbestimmungen ermittelt und die Relation D : N täglich in üblicher Weise berechnet.

Am vierten Versuchstage erhielt das Tier eine Injektion von 200 ccm 20proz. Lösung des neutralen Candiolinnatriums, entsprechend einer Gesamtmenge von 40 g Candiolinnatriums, enthaltend 16,8 g an Phosphorsäure gebundenen Zucker.

Trotz der großen injizierten Menge der sehr konzentrierten, 20proz. Lösung wurde die Injektion unter sterilen Kautelen ohne Schmerzens-

äußerungen und ohne nachfolgende Reizerscheinungen oder Nekrosen vertragen und die Resorption der großen Flüssigkeitsmenge erfolgte ganz auffallend schnell innerhalb weniger Stunden.

Auch hat die Injektion nicht nur keinen vermehrten Eiweißzerfall ausgelöst, vielmehr die Stickstoffausscheidung merklich herabgedrückt.

Die Zuckerausscheidung war vom zweiten bis fünften Versuchstage recht konstant (21,5 bis 28 g Dextrose). Eine absolute Mehrausscheidung von Zucker war nicht wahrnehmbar, wohl aber bewirkte das Absinken der Stickstoffausscheidung ein Emporschnellen des Quotienten D : N, der am zweiten und dritten Tage etwa 3,0 betragen hatte, auf 4,8. Am nächsten Tage sank der Quotient D : N annähernd auf 3 herab.

Am folgenden Tage traten leichte Krämpfe auf, die uns veranlaßten, den Versuch abzubrechen; das Tier erholte sich alsbald.

Der jähe Anstieg des Quotienten D : N spricht wohl immerhin dafür, daß eine Umformung der Hexosephosphorsäure zu Harnzucker stattgefunden haben konnte. Leider standen uns nicht ausreichend große Mengen des kostbaren reinen Materials zur Verfügung, um den Versuch wiederholen zu können.

Tabelle V.

Phlorrhizindiabetischer Hund, vollständige Karenz, mit Hexosephosphatinjektionen; Glykoneogenie.

Datum	Tag	Harn-Vol.	Fäces	Zucker nach *Bertrand*	Stickstoff im Harn	Relation D : N	Injektionen von		Gewicht	Anmerkungen
							Phlorrhizin	Hexosediphosph.		
		ccm		g	g		g	g	kg	
14. I. 1925	1.	122		6,161 6,075	1,366 1,366	4,47	1,00		9,3	Nach 2tägigem Hunger Wasser ad libitum
15. I.	2.	635		28,035 27,680	9,290 9,550	2,96	1,00			
16. I.	3.	660		23,760 24,060	7,715 7,808	3,08	1,00			
17. I.	4.	1430		25,740 23,466	5,105 5,005	4,79	1,000	40,0 entspr. 16,8 Hexose		
18. I.	5.	1045		21,450 21,736	7,315 7,315	2,95	1,00		8,0	Leichte Krämpfe

D. Stoffwechselversuch zur Prüfung der Beeinflussung der Phosphatausscheidung durch eine große Zuckergabe am Hungerhunde.

Eine Zufallsbeobachtung bei unserem Stoffwechselversuch A, wo das Versuchstier am 5. Versuchstage irrtümlich die doppelte Zuckermenge (160 g statt 80 g) erhalten hatte und wo demzufolge die P_2O_5-Ausscheidung jäh von 0,308 auf 1,551 g P_2O_5 angestiegen war, veranlaßte uns, den Einfluß der einmaligen Beibringung einer sehr großen Zuckermenge auf die P_2O_5-Ausscheidung eines hungernden Hundes zu verfolgen (Tabelle VI).

Die große Zuckerdosis von 150 g am 8. Versuchstage bewirkte am 9. eine alimentäre Glykosurie; es war zwar ein geringer Anstieg der Phosphorsäureausscheidung bemerkbar, jedoch hatte dieselbe während des ganzen Versuchs, ebenso wie die Stickstoffausscheidung eine steigende Tendenz. Die Relation N/P_2O_5 war im Anschluß an die orale Zuckerdarreichung nur sehr wenig abgesunken.

Wir konnten also keine charakteristische Beeinflussung der P_2O_5-Ausscheidung durch die Zuckergabe feststellen.

Anhangsweise möchten wir bemerken, daß hexosediphosphorsaures Natrium keineswegs als völlig indifferente Substanz anzusehen ist. Der Hund im Versuch D hatte zwar mehr als 4,0 g hexosediphosphorsaures Natrium pro Kilogramm Körpergewicht anscheinend ohne Schaden vertragen.

Dagegen sahen wir ein Meerschweinchen von 235 g Gewicht, das an aufeinander folgenden Tagen 5,5, 5,75, 10,0 g Candiolinnatrium in 10proz. Lösung pro Kilogramm subkutan erhalten hatte, wenige Stunden nach der letzten Injektion zugrundegehen.

Ein anderes *Meerschweinchen*, 245 g Gewicht, wurde nach subkutaner Injektion von 12 ccm hexosediphosphorsaurem Natrium, in 10proz. Lösung 1,2 g Substanz enthaltend, 5,0 g pro Kilogramm Körpergewicht entsprechend, nach Verlauf von 8 Stunden tot aufgefunden.

Genauere Untersuchungen zur Feststellung der Toxizität sind von Herrn *N. Abelles* in diesem Laboratorium ausgeführt worden.

Die letale Dosis für Ratten dürfte für das neutrale hexosediphosphorsaure Natrium um 4,5 g pro Kilogramm Körpergewicht liegen; die letale Dosis für Na_2HPO_4 (ohne Kristallwasser), das mit Salzsäure neutralisiert wurde, dürfte bei 2,0 g pro Kilogramm Körpergewicht liegen, wobei zu beachten ist, daß das Candiolinnatrium nur zu etwa einem Drittel aus P_2O_5 besteht.

Zusammenfassung.

1. Durch zahlreiche vorliegende Organbreiversuche ist zwar die Spaltbarkeit von Hexosediphosphorsäure durch zerkleinerte Gewebe sowie durch Gewebssäfte ausreichend dargetan. Dagegen ist das Verhalten der Hexosediphosphorsäure im lebenden Organismus noch nicht genügend studiert, und sind die vorliegenden Untersuchungen über vermehrte Ausscheidung anorganischen Phosphats im Harn nach Beibringung von Hexosediphosphorsäure per os insofern nicht eindeutig, als die Substanz im Darme einer Spaltung durch Mikroorganismen unterliegt.

Es ergab sich daher die Notwendigkeit, das Verhalten parenteral beigebrachter Hexosediphosphorsäure in Stoffwechselversuchen zu prüfen.

Tabelle VI.

Beeinflussung der Phosphatausscheidung durch eine große Zuckergabe am Hungerhund.

Datum	Tag	Harn-Vol. ccm	Gesamt-P_2O_5 im Harn	P_2O_5 Mittel	Gesamtstickstoff im Harn	Mittel N im Harn	Alimentäre Glykosurie	Relation N/P_2O_5	Wasser ccm	Rohrzucker g
22. I. 25	1.	280	0,343		2,011					
23. I.	2.	280	0,343		2,011					
24. I.	3.	280	0,343		2,011			5,8		
25. I.	4.	280	0,343		2,011					
26. I.	5.	280	0,343		2,011				300	
27. I.	6.	260	0,509 0,498	0,503	1,747 1,820	1,783		3,5	300	
28. I.	7.	235	0,685 0,680	0,682	2,162 2,178	2,170		3,2	300	
29. I.	8.	225	0,873 0,870	0,872	2,087 2,175	2,131		2,3	300	150
30. I.	9.	245	0,983 0,992	0,988	2,659 2,600	2,630	4,059 4,058	2,6	300	

Anmerkung. Zunächst wurde Wasser ad libitum gereicht. Da die Wasseraufnahme am 5. Tage verweigert wurde, wurden vom 5. Versuchstage täglich 300 ccm Wasser mit der Schlundsonde eingeführt.

2. Als Material für unsere Versuche diente uns das reine *neutral und saure hexosediphosphorsaure Natrium*, das uns von der Firma *Bayer & Co., Leverkusen*, in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt worden ist.

3. Um jedoch eine feste Grundlage für exakte Stoffwechselversuche zu gewinnen, ergab sich die Notwendigkeit, die Reinheit der angewendeten Präparate durch *eingehende Analysen zu prüfen*.

Dieselben bezogen sich außer auf die Elementaranalyse insbesondere auf die Ermittlung des Phosphorsäure- und Natriumgehalts sowie auf das Reduktionsvermögen vor und nach der Hydrolyse.

4. Während die Phosphorsäure- und Natriumbestimmung und die Elementaranalysen genügende Übereinstimmung mit den durch die Formeln geforderten Werten ergaben, stellte sich in bezug auf das *Reduktionsvermögen* sowohl direkt als nach Säurehydrolyse eine grobe Diskrepanz insofern heraus, als nur etwa bestenfalls die Hälfte des theoretischen Zuckerwertes auf diesem Wege sichergestellt werden konnte.

5. Um diesen Widerspruch aufzuklären, hat der eine von uns, *J. Marian*, das *Verfahren zur quantitativen Ermittlung des Glycerins nach Hehner* durch Oxydation mit Kaliumbichromat in schwefelsaurer Lösung auf die *maßanalytische Bestimmung von Kohlehydraten* übertragen. Es ergab sich, daß die Methode auf Glucose, Fructose und Dioxyaceton mit einer Fehlergrenze von wenigen Prozenten anwendbar ist und daß dieselbe sonach auch für andere Zuckerarten anwendbar sein dürfte.

Wir beabsichtigen dieselbe insbesondere auch für polymere Kohlehydrate mit zyklischer Struktur (Cellulose, Chitin) zu prüfen. Für Hexosediphosphorsäure gab jedoch auch diese Methode nur rund ein Viertel des theoretisch geforderten Wertes. Ob diese Anomalie durch eine schwer angreifbare zyklische Struktur des Zuckerphosphorsäureesters bedingt ist oder aber durch eine unvollständige Oxydation verursacht wird, müssen weitere Versuche lehren.

6 *Das Verhalten der parenteral beigebrachten Hexosediphosphorsäure im Organismus* des Hundes wurde in Stoffwechselversuchen einerseits am eiweiß- und phosphorarm ernährten Hunde (Zucker-Speckfütterung), andererseits am *Hungerhunde* geprüft. Es ergab sich dabei, daß die Hexosediphosphorsäure einer weitgehenden *Spaltung* im lebenden Organismus unterliegt, wobei nur ein Teil der darin enthaltenen Phosphorsäure in Form anorganischer Harnphosphate zutage tritt.

7. Ein erheblicher Teil der in Form des Zuckerphosphorsäureesters zugeführten P_2O_5-Menge wird jedoch im Organismus *zurückgehalten*, wobei es immerhin naheliegt, an eine Verwertung desselben –

vielleicht zum Zwecke des Ersatzes von verbrauchtem Lactacidogen — zu denken.

Bei einem Versuch betrug die *Retention* nach der ersten Injektion 80 Proz., nach der zweiten 46 Proz. der in Form des Phosphorsäureesters injizierten Menge. In einem zweiten Versuch mit einem kleineren und jüngeren Tiere im Hungerzustande betrug die Retention nach der ersten Injektion 63 Proz., nach der zweiten Injektion 22 Proz.

8. Nach einmaliger Zufuhr von 40,0 g des neutralen Hexosediphosphorsäureesters trat keine alimentäre Glykosurie auf. Die Beobachtung der D : N-Relation am *phlorrhizindiabetischen Hunde* läßt eine Umformung der Kohlehydratkomplexes des Hexosediphosphorsäureesters zu Harnzucker immerhin möglich erscheinen.

9 Auffallend war der Umstand, daß selbst große Mengen des neutralen Salzes, in konzentrierter Lösung subkutan beigebracht, *keinerlei Reizerscheinungen hervorriefen* und sehr schnell zur Resorption gelangten.

Ein Hund hat die einmalige parenterale Verabreichung von mehr als 4,0 g des Esters pro Kilogramm Körpergewicht anscheinend ohne Schädigung vertragen.

Meerschweinchen sahen wir bei 7,5 bis 10 g pro Kilogramm subkutan gegebener Substanz in wenigen Stunden zugrunde gehen. Die mäßige Toxizität der Substanz dürfte durch die im Organismus daraus abgespaltene Phosphorsäure ausreichend erklärt sein.

Verteilung des Eiweißstickstoffs im Muskelgewebe.

Von

G. E. Wladimiroff.

(Aus dem Laboratorium der physiologischen Chemie an der Militär-Medizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 21. Oktober 1925.)

Die Frage nach dem Eiweißbestand der Muskeln ist trotz einer Reihe ihr gewidmeten Untersuchungen bis jetzt nicht endgültig gelöst.

In der Literatur finden sich zwei Richtungen, welche sich voneinander sowohl durch die Methodik des Studiums der Muskelfasereiweißstoffe als auch durch die Klassifikation derselben unterscheiden. Beide Richtungen gehen von *Kühne* aus. Die eine beruht auf der Gewinnung des Muskelplasmas durch Auspressen der mit physiologischer Lösung ausgewaschenen, fein zerteilten und gefrorenen Muskelmasse. Das charakteristische Kennzeichen des Muskelplasmas ist seine Fähigkeit, spontan zu gerinnen, unter Ausscheidung eines besonderen Eiweißstoffes, den *Kühne* Myosin genannt hat. Aus dem Muskelplasma hat *Kühne* drei Eiweißstoffe ausgeschieden, welche sich voneinander durch ihre physikalischen Eigenschaften und insbesondere durch die Gerinnungstemperatur unterscheiden: 1. ein bei 45° C gerinnender Eiweißstoff, 2. Kalialbuminat und 3. ein bei 75° gerinnender Eiweißstoff (Serumalbumin). *Halliburton* (1), der dieselbe Methodik angewandt hat, unterscheidet schon fünf verschiedene Eiweißstoffe: Paramyosinogen (Gerinnungstemperatur 47° C), Myosinogen (56°), Myoglobulin (63°) — drei Eiweißstoffe vom Globulincharakter, weiter Albumin (75°) und Myoalbumose (gerinnt bei Erwärmen nicht). Weiter kam *Fürth* (2) im Jahre 1895 nach sorgfältigen Untersuchungen des Muskelplasmas zum Schluß, daß von den Eiweißstoffen des Muskelplasmas die überwiegende Mehrzahl nur zwei Eiweißstoffe vorstellen — Myosin (das bei 45° gerinnende Eiweiß von *Kühne*, das Paramyosinogen *Halliburtons*) und Myogen (Kalialbuminat von *Kühne*, Myosinogen *Halliburtons*). Dem letzteren spricht *O. Fürth* die Globulinnatur ab, indem er es für einen Eiweißstoff sui generis hält. Das Myoglobulin *Halliburtons* unterscheidet sich nach *O. Fürth* durch nichts vom Myosinogen. Im Muskelplasma findet sich sehr wenig Albumin. Myoalbumose konnte *O. Fürth* gar nicht finden. Endlich zeigte

in der letzten Zeit *H. Weber* (3), daß Myogen und Myosin des Muskelplasmas eigentlich einen und denselben Eiweißstoff vorstellen.

In allen diesen Untersuchungen blieb der Rest der Muskelmasse nach dem Auspressen des Muskelplasmas qualitativ unerforscht und quantitativ inkonstant, was die quantitative Bestimmung des Gehalts an verschiedenen Eiweißstoffen in der Muskelfaser unmöglich machte.

Indessen kann nur das Studium der quantitativen Wechselbeziehungen die Möglichkeit geben, die funktionellen Eigenschaften der Muskeln mit der Eigenart ihrer chemischen Zusammensetzung zu verknüpfen.

In dieser Hinsicht verdient die zweite Methodik Beachtung — die Extraktionsmethodik, welche schon von *Kühne* angewandt wurde, aber ausführlich in den Untersuchungen russischer Autoren von *A. J. Danilewsky* und seiner Schule weitergeführt ist. Ihr Prinzip besteht darin, daß das Myosin *Kühnes* durch Lösungen neutraler Salze gut extrahiert wird: 10proz. Kochsalzlösung (*Kühne*) oder 8- bis 15proz. Salmiaklösung [*A. J. Danilewsky* (4)], die von *Danilewsky* (4) selbst für die quantitative Myosinbestimmung empfohlen ist. Nach der Extraktion des letzteren bewahrt die Muskelfaser ihre Struktur (die Querstreifung). Daher nannte *A. J. Danilewsky* den Rest nach der Extraktion des Myosins das Myostroma. Eine Reihe quantitativer Bestimmungen des Myosins und Myostromas in verschiedenen Muskeln, bei verschiedenen Tieren im Zustande der Ruhe, der Tätigkeit usw. wurden von *A. J. Danilewsky* und seinen Schülern *N. Umikoff* (7), N. *Sselichowski* (8), *D. Kuraeff* (9), *M. D. Iljin* (10) und dann von *Saxl* (11) unter der Anleitung von *O. Fürth* ausgeführt. Weiter erhielt *A. J. Danilewsky* (12) durch Extraktion des Myostromas durch verdünnte Soda- (oder Ätzlaugen-) Lösung einen Eiweißstoff, der nach seinen Eigenschaften dem Myosin unähnlich war. Diesen Eiweißstoff nannte er Myostromin, es ist in Lösungen neutraler Salze und schwacher Säuren unlöslich, in schwachen Laugenlösungen löslich. Somit bilden den Grundbestandteil der Eiweißstoffe der Muskelfaser nach *A. J. Danilewsky* zwei Typen der Eiweißarten — Myosin und Myostromin. Diese beiden Eiweißstoffe sind von *M. D. Iljin* genau und eingehend studiert, sowie weiter im Laboratorium des letzten von *J. Gessner* (13). Eine wesentliche Bedeutung für das weitere hat der Umstand, daß beide Autoren als Extraktionsmittel für Myosin eine schwache (0,5- bis 2,5prom.) Essigsäurelösung anwandten. Die Eigenschaften des auf diese Weise erhaltenen Myosins und Myostromins waren folgende.

Nach den Angaben von *M. D. Iljin* stellt das Myosin ein Proteid dar, welches aus einem Globulin- und Nucleinbestandteil mit dem Überwiegen der Globulineigenschaften besteht. Die quantitative Bestimmung des Phosphors gab 0,0245 Proz., des Schwefels 1,06 Proz. und des Eisens 0,0535 Proz.

Das Myostromin ist auch ein Proteid aus einem Globulin- und Nucleinbestandteil, aber mit dem Überwiegen der Nucleineigenschaften. Nach der Inkonstanz des Gehalts an der zweiten Komponente und nach den Schwankungen der Löslichkeit ist das Vorhandensein einiger Formen der Myostromine anzuerkennen, was auch noch von *A. J. Danilewski* vermerkt ist. Im Durchschnitt enthält Myostromin 0,70 Proz. P, 45 Proz. S und 0,22 Proz. Fe. Somit ist das Myostromin an Phosphor 28mal und an Eisen viermal reicher als das Myosin. *E. Gessner*, der die quantitativen Verhältnisse einiger Aminosäuren im Myosin und Myostromin untersucht hat, gibt folgende Zahlen:

Mittelwerte für Myosin und Myostromin.

	Myosin			Myostromin		
	nach *Kossel*	nach *v. Slyke* N	nach *v. Slyke* N Proz.	nach *Kossel*	nach *v. Slyke* N	nach *v. Slyke* N Proz.
Gesamt-N	—	16,8	—	—	15,88	—
Melanin-N	—	2,8	16,6	—	3,15	19,17
Ammoniak-N	—	0,98	5,8	—	0,98	6,1
Monoamin-N	—	7,84	46,6	—	6,08	38,2
Imid-N (Prolin und Oxyprolin)	—	1,72	10,2	—	1,43	9,0
Arginin	2,27	2,22	13,2	1,74	1,72	10,8
Histidin	0,47	0,43	2,5	0,52	0,50	3,1
Lysin	0,75	0,78	4,9	1,97	1,98	12,4
Summe:	—	—	99,8	—	—	99,3

Somit enthält Myosin mehr Gesamtstickstoff als Myostromin, mehr Monoamin-N, Arginin und viel weniger Lysin. Die Arbeiten der genannten beiden Untersucher zeigten, daß Myostromin sich vom Myosin nicht nur durch seine physikalischen Eigenschaften, sondern auch durch die chemische Zusammensetzung unterscheidet. Der quantitative Gehalt derselben in den verschiedenen Muskeln kann nicht als endgültig erforscht gelten, da wir die zahlreichen Untersuchungen von *A. J. Danilewsky* und Mitarbeitern nicht benutzen können, weil sie 1. als Lösungsmittel nicht eine schwache Essigsäurelösung, sondern eine Salmiaklösung anwandten und weil sie 2. quantitativ nicht das Myostromin, sondern das Myostroma, das ist den ganzen Rest des Muskelgewebes nach der Extraktion des Myosins bestimmten.

Daher wandte ich mich auf Vorschlag von *M. D. Iljin* im Winter 1923 der Klarstellung dieser Verhältnisse in den Muskeln des Menschen zu, welche verschiedene Intensität ihrer Funktionen sowie anatomische Unterschiede aufweisen, nämlich im Herzmuskel, im Diaphragma und in dem M. ilio-psoas.

Methodik.

Der Gehalt verschiedener Eiweißarten wurde nach der Stickstoffmenge, die nach *Kjeldahl* berechnet wurde, bestimmt.

Makroskopisch normale Muskeln ohne degenerative Kennzeichen wurden aus dem pathologisch-anatomischen Institut 24 Stunden post mortem entnommen. Sorgfältig vom Fette befreit und von Aponeurosen und Sehnen abpräpariert, wurden sie mit dem Messer auf einer Ebonitplatte fein zerkleinert. Kleine Portionen zu 1 bis 1½ g nahm man für die Bestimmung der festen Stoffe und des Gesamtstickstoffs. Für die quantitative Bestimmung nach den Fraktionen nahm man Proben von 7 bis 13 g, legte sie in einen Erlenmeyerkolben von 500 bis 800 ccm Volumen, in welchem die Extraktion ausgeführt wurde. Als erstes Extraktionsmittel wandte man 0,5proz. Chlornatriumlösung an. Sie wäscht aus der Muskelmasse das Blut aus und extrahiert Extraktivstoffe und Eiweißstoffe vom Albumincharakter. In das Gefäß goß

man etwa 400 ccm der Lösung ein, die Muskelmasse wurde energisch mit einem Glasstäbchen mit einem Gummiaufsatz umgerührt. Nach einigem Stehen wurde die gefärbte Flüssigkeit vorsichtig auf ein Filter abgegossen, in das Gefäß wurde wieder die Waschflüssigkeit hinzugefügt und das so lange wiederholt, bis das erhaltene Filtrat völlig farblos war und beim Kochen nach Sättigung mit Na_2SO_4 und Ansäuerung mit Essigsäure kein Eiweißgerinnsel gab. Gewöhnlich verbrauchte man für die Spülung 1½ bis 2 Liter Flüssigkeit. Die erhaltenen Filtratportionen wurden in ein großes konisches Glas gegossen, etwas mit einem Gemisch von Essigsäure mit essigsaurem Natron angesäuert, so daß p_H etwa 5,5 bis 6,0 war, und bis zum Sieden erwärmt. Der gewonnene Niederschlag wurde auf ein Filter gesammelt, mit heißem Wasser, siedendem Alkohol und mit Äther gewaschen und nach *Kjeldahl* für die Stickstoffbestimmung verascht. Als Katalysator gebrauchte man K_2SO_4. Das Filtrat von dem Niederschlag wurde eingeengt, in den *Kjeldahl*kolben übergeführt und gleichfalls verascht. Als Katalysator diente das aus dem essigsauren Natron und der Schwefelsäure entstandene schwefelsaure Natrium. Da die Hauptmasse dieser ersten Extraktion Albumine und Extraktivstoffe bilden, so werden sie unter diesem Namen in den Tabellen angeführt sein.

Die ausgespülte Muskelmasse wurde weiter mit 0,25proz. Essigsäurelösung extrahiert. Die Lösung der extrahierten Eiweißstoffe wurde auf dieselben Filter gegossen, durch welche die erste Extraktion filtriert wurde. Die Extraktion mit Essigsäure setzt man so lange fort, bis das erhaltene Filtrat bei der Neutralisation und Sieden keinen Niederschlag gab. Gewöhnlich brauchte man 1200 bis 1500 Essigsäurelösung dazu. In den gesammelten Filtraten wurde das Eiweiß durch Neutralisation bis zu schwach saurer Reaktion (p_H 5,5 bis 6,0) unter Erwärmen bis 80° C niedergeschlagen. Mit dem Filtrat und dem Niederschlag verfuhr man ebenso wie mit den Albuminen. Diese Fraktion ist in den Tabellen als Myosin bezeichnet.

Darauf wurde aus dem Rest der Muskelmasse das Myostromin mit 0,25proz. Ätzkalilösung extrahiert. Die Myostrominlösung wurde auf dieselben Filter gegossen. Die Extraktion dauerte so lange fort, bis das erhaltene Filtrat aufhörte, einen Niederschlag bei der Neutralisation unter Erwärmen bis zum Sieden zu geben. Im Filtrat wurde das Myostromin durch Neutralisation unter Erhitzen bis zum Siedepunkt gefällt. Die weitere Behandlung war dieselbe wie bei den Albuminen und dem Myosin.

Endlich wurden die Filter mit dem auf ihnen befindlichen Rest, der hauptsächlich aus Bindegewebe besteht, mit heißem Wasser und kochendem Alkohol ausgespült und im Soxhletapparat mit Äther bearbeitet, worauf sie nach *Kjeldahl* verascht wurden.

Die Filter, durch welche alle Extraktionen passieren, verstopfen sich rasch, und die Filtration geht sehr langsam vor sich. Die ganze Analyse dauert daher 30 bis 40 Tage. Um die autolytische Wirkung des Gewebes und den Einfluß der Bakterienflora zu vermeiden, wurde die Untersuchung in der Winterzeit angestellt, wobei die Extraktion und Filtration in einem kalten Zimmer bei 1 bis 3⁰ R ausgeführt wurde. Außerdem legte man reine Eisstückchen ein und fügte eine alkoholische Thymollösung hinzu.

Ergebnisse der Analysen.

Herzmuskel. Die erste Analyse stellt eine orientierende Untersuchung vor, um die Bedeutung der Schwankungen der Konzentration des Extraktionsmittels klarzustellen.

Aus Tabelle Ia ersieht man, daß ein bedeutender Teil der Albumine, des Myosins und Myostromins nicht in den Niederschlag gelangt: Im Falle des Myosins etwa 30 Proz., im Falle der Myostromine noch mehr. Um sich eine Vorstellung über die relative Menge beider zu bilden, läßt sich die Tabelle Ia in folgender Tabelle Ib zusammenstellen.

Wie man aus dieser Tabelle ersieht, liegt kein Unterschied in den Zahlen für Albumine und Extraktivstoffe im Falle der Extraktion mit destilliertem Wasser oder 0,5proz. Kochsalzlösung vor. Die Zunahme der Konzentration der Essigsäure beeinflußt bedeutend die Menge des extrahierten Myosins. Endlich hat die Steigerung der Konzentration des Ätzkalis über 0,25 Proz. keine Bedeutung, da 0,25 proz. KOH das Myostromin ebenso vollständig wie 1 proz. KOH extrahiert.

In allen folgenden Analysen wurden als Extraktionsmittel nacheinander 0,5proz. NaCl, 0,25proz. CH_3COOH und 0,25proz. KOH angewandt.

Im Durchschnitt befinden sich im Herzmuskel des Menschen alle drei Formen der Eiweißstoffe ungefähr in gleichen Mengen.

M. ilio-psoas. Die Hauptmasse der Eiweißstoffe dieses Muskels bildet das Myosin (s. Tabellen IV und V).

Diaphragmamuskel. In den Muskeln des Diaphragmas wiegt das Myosin vor, aber weniger prägnant als im M. ilio-psoas. Einen beträchtlichen Teil bildet auch das Myostromin (s. Tabellen VI und VII).

Bewertung der Resultate.

Ehe wir zu weiteren Schlußfolgerungen übergehen, müssen wir klarstellen, inwieweit für den vorliegenden Zweck die Methodik geeignet ist. Wie die Beobachtung und das Zahlenmaterial zeigen, haften ihr eine Reihe wesentlicher Mängel an. Den Hauptmangel stellt das Fehlen der Zuversicht, daß die einzelnen Eiweißfraktionen streng geschieden werden. Darauf weisen die Schwankungen der bestimmbaren Quantität

Tabelle 1 a.

Stickstoffverteilung nach Eiweißfraktionen. (Muskel des linken Ventrikels eines am Kanzer gestorbenen 40 jährig. Mannes.)
Feste Stoffe (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 20,58 Proz.
Gesamtstickstoff im Verhältnis zu fester Substanz 12,83 Proz.

Nr.		1. Probe 8,219			2. Probe 10,086			3. Probe 9,501			4. Probe 8,798		
		N mg	N zu festen Stoffen Proz.	Extraktionsmittel	N mg	N zu fester Substanz Proz.	Extraktionsmittel	N mg	N zu fester Substanz Proz.	Extraktionsmittel	N mg	N zu fester Substanz Proz.	Extraktionsmittel
1	Albumin (Niederschlag)	21,28	1,26	0,5 proz. NaCl	36,54	1,76	0,5 proz. NaCl	40,88	2,09	destill. Wasser	32,76	1,81	destill. Wasser
2	Albumin + Extraktivstoffe (Filtrat) .	37,24	2,20		42,70	2,05		28,70	1,47		32,76	1,81	
3	Myosin (Niederschlag)	41,86	2,475	0,1 proz. CH_3COOH	54,04	2,60	0,15 proz. CH_3COOH	73,92	3,78	0,25 proz. CH_3COOH	97,44 (Niederschlag)	5,38	0,25-, 0,5- bis 1,0 proz. KOH
4	Myosin (Filtrat) . .	19,18	1,135		29,26	1,41		19,88	1,01				
5	Myostromin (Niederschlag)	49,14	2,91	0,25 proz. KOH	61,88	2,98	0,25 proz. KOH	—	—		+	+	
6	Myostromin (Filtrat)	32,48	1,92		31,22	1,52		—	—		56,42 (Filtrat)	3,11	
7	Rest	18,62	1,10		19,74	0,95		—	—		17,50	0,97	
	Summe:	219,80	13,00		275,38	13,26		—	—		236,88	13,08	

Anmerkung: Die Filter mit den Niederschlägen wurden weder mit Alkohol noch mit Äther ausgewaschen.

Tabelle Ib.

Nr.		I Menge fester Substanzen Proz.	I Extraktionsmittel	II Menge fester Substanzen Proz.	II Extraktionsmittel	III Menge fester Substanzen Proz.	III Extraktionsmittel	IV Menge fester Substanzen Proz.	IV Extraktionsmittel
1	Albumin + Extraktivstoffe	3,46	0,5 proz. NaCl	3,82	0,5 proz. NaCl	3,56	destill. Wasser	3,62	destill. Wasser
2	Myosin	3,61	0,1 proz. CH_3COOH	4,01	0,15 proz. CH_3COOH	4,79	0,25 proz. CH_3COOH	8,49	0,25- bis 1,0 proz. KOH
3	Myostromin .	4,83	0,25 proz. KOH	4,48	0,25 proz. KOH	—			
4	Rest	1,10		0,95		—		0,97	
	Summe:	13,00	—	13,26	—	—	—	13,08	—

Tabelle II.

Herzmuskel der linken Kammer eines 28jährigen Mannes, der an Geisteskrankheit litt. Feste Substanzen (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 20,08 Proz. Gesamtstickstoff im Verhältnis zu den festen Substanzen (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 13,23 Proz.

Nr.		1. Probe 13,4305 N mg	1. Probe N zu festen Substanzen Proz.	1. Probe N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Stoffen Proz.	2. Probe 8,3750 N mg	2. Probe N zu festen Substanzen Proz.	2. Probe N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen Proz.
1	Albumin (Niederschlag)	35,98	1,28	3,58	19,46	1,11	3,70
2	Albumin + Extraktivstoffe (Filtrat) . . .	64,54	2,30		45,36	2,59	
3	Myosin (Niederschlag)	85,26	3,04	4,36	53,76	3,07	4,46
4	Myosin (Filtrat) . . .	37,10	1,32		24,36	1,39	
5	Myostromin (Niederschlag)	73,50	2,62	3,87	50,54	2,89	3,76
6	Myostromin (Filtrat) .	35,00	1,25		15,26	0,86	
7	Rest	32,34	1,15	1,15	20,86	1,19	1,19
	Summe:	363,72	12,96	12,96	229,60	13,12	13,12

in der ersten Fraktion hinsichtlich des Myosins hin; eben darauf weist auch die folgende Tatsache hin: Bei lange dauerndem Stehen tritt im Filtrat der Spülwasser eine Trübung, die von dem Ausfallen einer geringen Menge eines feinen Niederschlags abhängt, ein. Endlich ist das Myosin auch nach seinen Eigenschaften als Globulin, im Wasser allein, das von Elektrolyten gänzlich frei ist, völlig unlöslich, was in unserem Falle nicht der Fall war. Somit gehen in Abhängigkeit von einer ganzen Reihe Bedingungen (Muskelzustand, Extrahierungsdauer,

Tabelle III.

Muskel der linken Herzkammer eines 39jährigen, an Peritonitis gestorbenen Mannes. Feste Substanz (Durchschnitt aus fünf Bestimmungen) 21,29 Proz. Gesamtstickstoff im Verhältnis zu festen Substanzen (Durchschnitt aus fünf Bestimmungen) 12,77 Proz.

Nr.		1. Probe 10,7106			2. Probe 7,7660		
		N mg	N zu festen Substanzen Proz.	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen Proz.	N mg	N zu festen Substanzen Proz.	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen Proz.
1	Albumin (Niederschlag)	40,18	1,76	3,97	34,58	2,09	4,20
2	Albumin + Extraktivstoffe (Filtrat) . . .	50,40	2,21		34,86	1,11	
3	Myosin (Niederschlag) .	38,92	1,71	3,15	27,86	1,68	2,80
4	Myosin (Filtrat) . . .	32,90	1,44		18,48	1,12	
5	Myostromin (Niederschlag)	46,60	2,04	4,50	36,26	2,19	4,83
6	Myostromin (Filtrat) .	56,00	2,46		43,68	2,64	
7	Rest	25,76	1,13	1,13	—	—	—
	Summe:	290,76	12,75	12,75	—	—	—

Tabelle IV.

M. ilio-psoas eines 28jährigen Mannes (vgl. Tabelle II). Feste Substanzen (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 20,02 Proz. Gesamtstickstoff (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 14,12 Proz.

Nr.		1. Probe 12,3635			2. Probe 7,4644		
		N mg	N zu festen Substanzen Proz.	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen Proz.	N mg	N zu festen Substanzen Proz.	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen Proz.
1	Albumin (Niederschlag)	70,42	2,84	4,03	22,68	1,52	4,06
2	Albumin + Extraktivstoffe (Filtrat) . . .	129,54	1,19		58,80	2,54	
3	Myosin (Niederschlag) .	11,30	4,49	7,10	66,36	4,44	6,03
4	Myosin (Filtrat) . . .	64,54	2,61		23,80	1,59	
5	Myostromin (Niederschlag)	33,32	1,34	1,87	18,48	1,24	1,81
6	Myostromin (Filtrat) .	13,02	0,53		8,54	0,57	
7	Rest	20,86	0,84	0,84	25,2	1,68	1,68
	Summe:	343,00	13,94	13,94	203,14	13,58	13,58

Tabelle V.

M. ilio-psoas. 39jähriger Mann (vgl. Tabelle III). Feste Substanzen (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 19,82 Proz. Gesamtstickstoff (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 14,30 Proz.

Nr.		1. Probe 9,2410			2. Probe 7,1492		
		N mg	N zu festen Substanzen Proz.	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen Proz.	N mg	N zu festen Substanzen Proz.	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen Proz.
1	Albumin (Niederschlag)	58,38	3,19	5,37	50,12	3,54	5,33
2	Albumin + Extraktivstoffe (Filtrat) . . .	40,04	2,18		25,34	1,79	
3	Myosin (Niederschlag) .	63,70	3,48	4,73	50,82	3,59	5,10
4	Myosin (Filtrat) . . .	22,82	1,25		21,42	1,51	
5	Myostromin (Niederschlag)	17,78	0,97	2,51	12,32	0,87	2,32
6	Myostromin (Filtrat) .	28,28	1,54		20,58	1,45	
7	Rest	26,16	1,43	1,43	15,68	1,11	1,11
	Summe:	257,16	14,04	14,04	196,28	13,86	13,86

Tabelle VI.

Diaphragmamuskel eines 28jährigen Mannes (vgl. Tabelle II). Feste Substanzen (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 20,47 Proz. Gesamtstickstoff (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 13,54 Proz.

Nr.		1. Probe 11,5515			2. Probe 5,8336		
		N mg	N zu festen Substanzen Proz.	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen Proz.	N mg	N zu festen Substanzen Proz.	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen Proz.
1	Albumin (Niederschlag)	70,98	1,29	4,29			
2	Albumin + Extraktivstoffe (Filtrat) . . .	30,66	3,00		—	—	—
3	Myosin (Niederschlag)	—	—	—	58,24	4,88	5,65
4	Myosin (Filtrat) . . .	—	—	—	9,24	0,77	
5	Myostromin (Niederschlag)	28,56	1,21	1,95	16,38	1,37	1,82
6	Myostromin (Filtrat) .	17,64	0,74		5,32	0,45	
7	Rest	45,36	1,92	1,92	—	—	—
	Summe:	—	—	—	—	—	—

Tabelle VII.

Diaphragmamuskel eines 39 jährigen Mannes (vgl. Tabelle III). Feste Substanzen (Durchschnitt aus zwei Bestimmungen) 15,44 Proz. Gesamtstickstoff (Durchschnitt aus vier Bestimmungen) 13,99 Proz.

Nr.		1. Probe 4,9706			2. Probe 6,9056		
		N	N zu festen Substanzen	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen	N	N zu festen Substanzen	N-Summe des Niederschlags und Filtrats zu festen Substanzen
		mg	Proz.	Proz.	mg	Proz.	Proz.
1	Albumin (Niederschlag)	19,88	2,59	3,98	28,28	2,65	4,20
2	Albumin + Extraktivstoffe (Filtrat) . . .	10,64	1,39		16,52	1,55	
3	Myosin (Niederschlag)	21,56	2,81	4,40	26,74	2,51	—
4	Myosin (Filtrat) . . .	12,18	1,59		—	—	
5	Myostromin (Niederschlag)	13,58	1,77	3,83	19,18	1,80	—
6	Myostromin (Filtrat) .	15,82	2,06		—	—	
7	Rest	9,80	1,28	1,28	16,94	1,59	1,59
	Summe:	103,46	13,49	13,49	—	—	—

Menge der Spülwasser usw.) außer den Extraktivstoffen und Albuminen eine größere oder geringere Myosinmenge über. Daher gibt die in Rede stehende Methodik wenigstens für das pathologisch-anatomische Material keine Möglichkeit, die Myosinmenge genau zu bestimmen.

In geringerem Grade bezieht sich das auf das Myostromin. Die Myosinlösung opaleszìert stets trotz der Filtration, d. h. es liegt in der Lösung außer den gelösten Eiweißstoffen eine feine Suspension so geringfügiger Myostrominteilchen vor, daß sie durch das Filter passieren. Bei lange dauerndem Stehen setzen sie sich auf dem Boden nieder. Weiter zeigt die Tabelle I, daß mit der Zunahme der Essigsäurekonzentration die Grenze zwischen dem Myosin und Myostromin verrückt wird, d. h. daß die schwächere Essigsäurelösung nicht das ganze Myosin extrahiert, oder, was noch wahrscheinlicher ist (worauf schon *A. J. Danilewsky*, *M. D. Iljin* u. a. hingewiesen haben), daß die stärkere Säurelösung auch imstande ist, eine gewisse Myostrominpartie zu extrahieren.

Unter dieser Einschränkung läßt sich aber das Myostromin nach dieser Methode bestimmen. Eine von den Grenzen zwischen dem Myostromin und dem Rest ist recht deutlich, weil die 0,25proz. Ätzkalilösung das Myostromin völlig extrahiert.

Eine ziemlich zufriedenstellende Konstanz, Beständigkeit der Zahlen für den Myostromingehalt in Kontrollbestimmungen mit verschiedenen Gewichtsproben bezeugt, daß auch zwischen dem Myosin und Myostromin die Grenze nicht sehr verschwommen ist.

Weiter haben wir den Stickstoff der reinen Eiweiße nur in den Fällen, in welchen sie auf das Filter gesammelt und darauf mit heißem Wasser, siedendem Alkohol und mit Äther bearbeitet waren. In unserem Falle wurde ein beträchtlicher Teil der Eiweißstoffe nicht niedergeschlagen. In den eingeengten Filtraten können außer diesen nicht niedergeschlagenen Eiweißstoffen noch andere stickstoffhaltige Substanzen vorhanden sein. Als solche erweisen sich im Falle des Filtrats der ersten Fraktion stickstoffhaltige Extraktivstoffe. In den Filtraten der beiden anderen Fraktionen kann die Rede vielleicht von dem Stickstoff einiger Lipoide sein. Der von ihnen abhängige Fehler kann jedoch nicht wesentlich sein.

Dies alles zusammengenommen, setzt den Wert der Methode beträchtlich herab, und veranlaßt, an die Bewertung der Resultate mit großer Vorsicht heranzutreten.

Die Mängel, die durch alle angeführten Ursachen bedingt sind, sind nicht so groß, daß sie die prägnant hervortretende Differenz in dem Eiweißgehalt der verschiedenen Muskeln hätten verwischen können. Die völlige Berechnung des Gesamtstickstoffs erlaubt, eine sichere Kontrolle der erzielten Resultate zu erhalten.

In einer letzten Bemerkung müssen wir noch darauf hinweisen, daß infolge postmortaler Veränderungen im Muskel die erzielten Resultate nicht völlig auf die lebenden Muskeln zu übertragen sind. Durch das postmortale Ödem werden die Muskeln an festen Substanzen ärmer. Es liegen auch Hinweise vor, daß dabei sich auch das quantitative Verhältnis des Myosins und Myostromins verändert. So hat *Sselichowski* (8) gefünden, daß beim Liegen der Kaninchenleiche im Laufe von 24 Stunden eine Abnahme des Myostromas zustande kommt bei einer Schwankung der Myosinmenge nach beiden Seiten. Aus den von ihm angeführten Tabellen können wir den Schluß ziehen, daß er nicht den Einfluß des postmortalen Ödems in Betracht gezogen hat. *Saxl* (11) fand im Gegenteil eine prägnante Zunahme des Myostromas. Die Essigsäure, welche wir benutzt haben, stellt vor der Lösung des Chlorammoniums den Vorzug dar, daß sie auch das geronnene, in der Chlorammoniumlösung unlöslich gewordene Myosin löst.

Schluß.

In seiner ausführlichen Arbeit hat *H. Weber* gezeigt, daß das Myogen und das Myosin des Muskelplasmas eigentlich einen Eiweißstoff vorstellen: ein lyophiles Kolloid mit dem isoelektrischen Punkte im Bereich p_H 6,3. In Lösungen mit starker Konzentration der Salze hat dieser Eiweißstoff eine andere Koagulationstemperatur, der iso-

elektrische Punkt verrückt sich bis p_H 5,0, es verändert sich der Löslichkeitsgrad. In dem Rest des Muskelgewebes fand *H. Weber* nach dem Auspressen des Muskelplasmas einen Eiweißstoff sui generis, welchen dieser Untersucher wegen seiner lyophoben Eigenschaften das Myosin zu nennen vorschlägt. Diese Nomenklatur ist unrichtig und unzweckmäßig, da sie die gewohnte, historisch berechtigte Terminologie umstürzt. *Kühne* und *W. Halliburton* verstanden unter dem Myosin das Eiweißgerinnsel, welches beim Gerinnen des Muskelplasmas entsteht. Wenn man, wie das *O. Fürth* getan hat, das Gerinnsel durch den Gebrauch des Wortes „Fibrin" bezeichnet, so muß man als Myosin den nicht denaturierten Eiweißstoff bezeichnen, der den Haupt- und nun können wir sagen den einzigen Eiweißbestandteil des Muskelplasmas bildet. In diesem Sinne benutzten eben *A. J. Danilewsky* und seine Schule die Bezeichnung „Myosin", indem sie einen Eiweißstoff vom Globulincharakter, der in Lösungen neutraler Salze löslich ist, so benannten. Nach der Extraktion des Myosins kann man, wie *A. J. Danilewsky* gezeigt hat (12), aus dem Muskelrest (Myostroma) einen Eiweißstoff sui generis extrahieren, der Myostromin genannt ist. Die Bezeichnung „Myostromin" ist sowohl in der russischen als auch in der ausländischen Literatur weit verbreitet. Es ist leicht, sich davon zu überzeugen, daß der Eiweißstoff sui generis, den *H. Weber* im Muskelrest entdeckt hat, sich als Myostromin erweist. Das Myostromin stellt nach den Untersuchungen von *M. D. Iljin* ein Nucleoglobulin vor. Die Nucleinkomponente setzt das p_H des isoelektrischen Punktes herab [*L. Michaelis* und *Davidson* (14)]. Daher kann man voraussagen, daß das Myostromin den isoelektrischen Punkt bei einem kleineren p_H haben wird, als das Globulin-Myosin. Weiter weist *H. Weber* selbst als auf die beste Methode der Trennung der beiden Eiweißstoffe des Muskelgewebes auf die Anwendung einer schwachen Acetatlösung beim $p_H = 5{,}0$ hin. Die Anwendung einer schwachen Essigsäurelösung schafft, wie das in unserem Falle war, fast identische Bedingungen, da die Muskeleiweißstoffe sich als gute Puffer erweisen. Daher sind wir der Meinung, daß für die spezifischen Eiweißstoffe des Muskelgewebes am richtigsten die folgende Nomenklatur sein wird:

1. Myosin (Eiweißstoff des Muskelplasmas, vom Globulincharakter, in konzentrierten Lösungen neutraler Salze und in schwachen Säuren löslich).

2. Myostromin (Eiweißstoff des Muskelstromas, ein Nucleoproteid, in Lösungen neutraler Salze und in schwachen Säuren nicht löslich).

Sich auf die Angaben von *J. Gessner* (13) stützend, nach welchen das Myostromin 15,88 Proz. Stickstoff enthält, können wir umgekehrt nach dem Stickstoff den Gehalt dieses Eiweißstoffes in den Muskeln berechnen.

Tabelle VIII.

Menge des Myostromins in Prozenten zu den festen Stoffen. (Nach dem Stickstoff der Tabellen I bis VII berechnet.)

Nr.		I	II	III
		40 jähriger Mann Proz.	28 jähriger Mann Proz.	39 jähriger Mann Proz.
1	Herzmuskel	29,3	24,1	29,4
2	Diaphragmamuskel.	—	11,9	24,1
3	M. ilio-psoas	—	11,6	15,7

Diese Tabelle zeigt, daß die Myostrominmenge in verschieden funktionierenden Muskeln bedeutend differiert. Der Herzmuskel, welcher energische rasche Kontraktionen ausführt, enthält die größte Myostrominmenge, welche von einem Viertel bis zu einem Drittel aller festen Substanzen beträgt. Der Diaphragmamuskel, der nach seinem histologischen Aufbau von ihm verschieden ist, aber auch beständig, wenn auch in einem anderen Tempo und Rhythmus als der erste arbeitet, nimmt in Hinsicht auf den Myostromingehalt eine Zwischenstellung zwischen dem Herzmuskel und den M. ilio-psoas ein, der sich an Myostromin am ärmsten erweist.

Somit sind die vorliegenden Angaben eine noch weitere Bestätigung der von *Danilewsky* gefundenen Wechselbeziehungen: 1. Mehr Myostromin ist in den Muskeln vorhanden, welche sich energisch und rasch kontrahieren und viel arbeiten, und 2. desto mehr Myostromin finden wir im Muskel, je älter das Subjekt ist, von welchem der Muskel stammt. Es ist zu vermerken, daß nach den Angaben von *Saxl* (11) die glatte Muskulatur (Uterusmuskel) in dieser Hinsicht eine Ausnahme bildet.

Es ist sehr wesentlich, die erhaltenen Ergebnisse mit den Angaben zu vergleichen, welche bei der Anwendung der Chlorammoniumlösung als Lösungsmittel für das Myosin erhalten sind. Die ersten Versuche von *Danilewsky* gaben für den Herzmuskel 2,91 Proz. Myosin und 11,44 Proz. Myostroma bei 20,85 Proz. fester Substanzen. Somit werden die festen Substanzen 14,44 Proz. Myosin und 54,87 Proz. Myostroma (= Myostromin + Rest) enthalten.

Die Analysen von *Sselichowski* (8) für den Herzmuskel gaben 5,32 Proz. (Frau) bis 5,64 Proz. (Mann) Myosin und 4,79 bis 5,27 Proz. Myostromin und für den M. biceps brachii 10,76 Proz. Myosin und 3,12 Proz. Myostromin. Die Menge fester Substanzen ist in keinem Falle angegeben. Der ungefähre Myostromagehalt wird für die festen Substanzen für das Herz 27 bis 28 Proz. und für den M. biceps brachii 15 bis 16 Proz. sein.

Die Analysen von *M. D. Iljin* (10) geben für die Skelettmuskeln im Durchschnitt 7,7 Proz. Myostroma, was ungefähr 38 bis 39 Proz. in Hinsicht auf die festen Substanzen beträgt.

Saxl (11) gibt für das normale menschliche Herz das Verhältnis des Myosins zum Myostroma 36,6 bis 37,1 : 63,4 bis 62,9 an, wobei 20 g Muskeln 3,55 bis 3,68 g der beiden oben genannten Eiweiße enthalten. Die Berechnung macht zum Verhältnis der festen Substanz ungefähr 55 bis 56 Proz. Myostroma aus.

Diese Angaben sind in bedeutender Weise bunt und in einigen Punkten einander direkt widersprechend. So hat *Sselichowski* beim Studium der postmortalen Erstarrung am Kaninchenmuskel bei Zimmertemperatur eine unbeträchtliche Abnahme des Myostromas bei kleinen Schwankungen des Myosins nach beiden Seiten gesehen. *Saxl* fand unter denselben Bedingungen eine Zunahme des Myostromas im Skelettmuskel um mehr als fünfmal! Hieraus zieht er den Schluß, daß nach dem Aufhören der Muskelerstarrung die geronnenen Eiweißstoffe des Muskelplasmas in ihrer Hauptmasse unlöslich bleiben. Übrigens ist für den Herzmuskel die Zunahme des Myostromas unbeträchtlich, und für den Uterusmuskel war diese Zunahme von *Saxl* nicht erwiesen.

Am natürlichsten ist es, alle diese Differenzen dadurch zu erklären, daß infolge verschiedener Bedingungen (Vollkommenheit der Zerkleinerung, Extraktionsdauer) bei verschiedenen Untersuchern ein Teil des Myosins nicht extrahiert blieb. Den größten Myosingehalt im Muskel gibt *Sselichowski*. Unsere Angaben stimmen am nächsten mit seinen Ergebnissen überein.

Schlußfolgerungen.

In der Muskelfaser finden sich zwei spezifische Abarten der Eiweißstoffe, welche sich voneinander prägnant durch ihre chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften unterscheiden.

Dem ersten von ihnen, dem Muskelplasmaeiweiß, einem Eiweißstoff vom Globulincharakter, ist richtiger, wie die Geschichte der Frage zeigt, die Benennung Myosin beizulegen. Die Bezeichnung „Myogen", welche aus der ersten entstanden ist (Myosin *Kühne* und *Danilewsky* → Myosinogen *Halliburton* → Myogen *Fürth*), und welche auch etymologisch keinen Sinn hat, ist nicht zu gebrauchen.

Der zweite — das Muskelstromaeiweiß, ein Nucleoproteid — ist aus eben demselben Grunde Myostromin zu nennen.

Die verdünnte Essigsäure stellt ein zuverlässigeres, das Myosin extrahierendes Mittel vor als die konzentrierte Salmiaklösung.

Die Methodik der Extraktion des Myosins durch verdünnte Essigsäure und des Myostromins durch eine schwache alkalische Lösung gibt die Möglichkeit selbst im Falle des pathologisch-anatomischen Materials, die Menge des Myostromins zu bestimmen, und auf diese Weise die chemische Charakteristik des Eiweißbestandes verschieden funktionierender Muskeln zu erhalten.

Von den untersuchten Muskeln ist der Herzmuskel an Myostromin am reichsten, der M. ilio-psoas am ärmsten, der Diaphragmamuskel nimmt die Zwischenstellung ein.

Am Schluß halte ich es für meine angenehme Pflicht, dem hochverehrten Herrn Prof. *M. D. Iljin* für das vorgeschlagene Thema und die beständige Anleitung zu danken.

Literatur.

1) *W. D. Halliburton*, Lehrb. d. chem. Physiol. u. Pathol. Heidelberg 1893. — 2) *O. Fürth*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **35**, 231, 1895. — 3) *H. Weber*, diese Zeitschr. **158**, 443 und 473, 1925. — 4) *A. J. Danilewsky*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **5**, 158, 1881. — 5) *E. Schipilowa* und *A. J. Danilewsky*, ebendaselbst **5**, 349, 1881. — 6) *A. J. Danilewsky*, ebendaselbst **7**, 124, 1882/83. — 7) *N. Umikoff*, Physiologische Schriften (Recueil physiologique) von Proff. *A. J.* und *W. J. Danilewsky* **2**, 1, 1891. Charkow. — 8) *N. Sselichowski*, Physiologische Schriften **1**, 347, 1888. Charkow. — 9) *D. I. Kuraeff*, Über den Eiweißbestand der Muskeln in der Ruhe und bei der Arbeit, Dissertation, St. Petersburg 1896. — 10) *M. D. Iljin*, Organisierte Eiweißstoffe der Muskelfaser. Dissertation, St. Petersburg 1900. — 11) *Saxl*, Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **9**, 1, 1907. — 12) *A. J. Danilewsky*, Physiologische Schriften **1**, 331, 1888. Charkow. — 13) *J. E. Gessner*, Verteilung des Stickstoffs im Myosin und Myostromin. Dissertation, Jurjeff 1916. — 14) *L. Michaelis* und *Davidson*, diese Zeitschr. **89**, 496, 1912.

Weitere Beiträge zur Lipasevergiftung durch Chinin und Atoxyl.

Von

P. Rona und **K. Gyotoku.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 21. Oktober 1925.)

Wie bekannt, hängen die zur Charakterisierung der Fermente herangezogenen Eigenschaften in hohem Grade von dem Zustand, in dem sich das Ferment befindet, ab; von der Umgebung, vom Reinheitsgrad und dergleichen. Schon lange weiß man dies vom Temperaturoptimum der Fermentwirkung. In jüngster Zeit zeigten namentlich die Untersuchungen von *Willstätter*, daß selbst Konstanten, wie die Lage der optimalen Wasserstoffzahl, neben anderen Faktoren (wie Neutralsalze) wesentlich durch den Reinheitsgrad des betreffenden Ferments bedingt ist[1]). So fanden *Willstätter*, *Haurowitz* und *Memmen* bei der Magenlipase von Mensch, Hund und anderen das Optimum der $H^{\cdot}$-Konzentration vom p_H etwa 5 bei der höchsten bis jetzt erreichten Reinigung auf p_H etwa 7,5 verschoben. Und daß die Wirkungen verschiedener Salze (Ionen) nur in Abhängigkeit mit anderen Faktoren, namentlich nur bei gleichzeitiger Berücksichtigung der Wasserstoffzahl, betrachtet werden dürfen, lehrt eine größere Reihe neuerer systematischer Untersuchungen[2]). Für den Biologen wird es natürlich stets wünschenswert sein, die Bedingungen, unter welchen er die Eigenschaft eines Ferments studiert, nicht zu weit von den physiologischen, im Organismus vorhandenen, zu entfernen, sofern diese nur stets sicher

---

[1]) „Die Einflüsse der begleitenden Stoffe erstrecken sich also auch auf die p_H-Aktivität wie das Verhalten gegen Adsorbenzien, gegen Aktivatoren, Hemmungskörper und Gifte, auf die Haltbarkeit, das Temperaturoptimum und die Zerstörungstemperatur der Enzyme." — *Willstätter*, *Haurowitz* und *Memmen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **140**, 205, 1924.

[2]) Über Rolle und Wichtigkeit der Begleitstoffe vgl. unter anderen namentlich *R. Willstätter* und *Fr. Memmen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **188**, 216, 1924.

reproduzierbar sind. So kann er noch am ehesten hoffen, auch unter den vereinfachten Bedingungen des Versuchs einen Einblick in das komplexe Geschehen des Zellebens zu gewinnen. Andererseits wird man stets bestrebt sein, die Eigenschaften möglichst an „reinen" Fermenten, frei von Beimengungen, zu studieren, wobei diese „Beimengungen" nicht etwa mit zufälligen Verunreinigungen verwechselt werden dürfen. Gerade bei den Fermenten wird man ja mit dem Begriff „Beimengungen" besonders vorsichtig sein müssen[1]).

Jedenfalls müssen die erwähnten Gesichtspunkte bei dem Studium der Giftwirkung auf die Fermente eingehend berücksichtigt werden. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, daß verschiedene Gifte auf Fermente in sehr charakteristischer Weise wirken. Es war nun zu prüfen, namentlich in Anlehnung an die *Willstätter*schen Untersuchungen[2]), wie mit zunehmendem Reinheitsgrad des Ferments die am ungereinigten Ferment beobachteten Giftwirkungen verändert werden und wieweit man in der Lage ist, diese Wirkung auf die „Beimengungen" und wieweit auf das Ferment als solches zu beziehen. Freilich wäre durch die Feststellung, daß das Gift nicht das Ferment als solches direkt beeinflußt, das Problem der Giftwirkung nur verschoben. Denn dann müßte gefragt werden, welcher Art diese Beimengungen sein müssen, die so fein differenziert auf einzelne Gifte reagieren. Hierfür fehlt uns zunächst die chemische Vorstellung. Dann müßte auch die weitere Frage aufgeworfen werden, wie diese Begleitstoffe mit dem Ferment verankert sein müssen, um ihrerseits unter der Giftwirkung die fermentativen Wirkungen in so spezifischer und in so gesetzmäßiger Weise zu beeinflussen, wie dies in zahlreichen Fällen gefunden wurde. Die Wichtigkeit des qualitativen und quantitativen Studiums der Giftwirkungen auch bei ungereinigten Fermenten bleibt demnach nicht ausschließlich auf die biologischen Probleme beschränkt.

Daß diese Fähigkeit, auf das Gift zu reagieren, eng an das Ferment geknüpft ist, zeigen frühere Versuche. Mischt man zwei Fermente, die sich gegen das Gift verschieden verhalten, in ihrem natürlichen Medium, z. B. im Serum, so wird das Verhalten des einen Ferments gegen das Gift nicht auf das andere übertragen, sondern jedes Ferment verhält sich so, als wenn es allein in der Lösung wäre[3]). Deutlich war

---

[1]) Vgl. hierzu die Ansichten von *Willstätter* über das Wesen des „Enzymkomplexes" (z. B. *R. Willstätter* und *Fr. Memmen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **188**, 217, 1924).

[2]) Vgl. vor allem *R. Willstätter* und *Fr. Memmen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **188**, 241, 1924.

[3]) Vgl. z. B. *P. Rona* und *D. Reinicke*, diese Zeitschr. **118**, 213, 1921; *P. Rona* und *R. Pavlovic*, ebendaselbst **134**, 108, 1922.

dies auch zu beobachten, als man reinere Fermente, die sich gegen dasselbe Gift verschieden verhielten, miteinander mischte. In Versuchen, in welchen die Lipasen verschiedener Organe durch Adsorption an Tonerde und nachheriger Elution gereinigt wurden, konnte in den Fermentmischungen das individuelle Verhalten jeder einzelnen Fermentart ebenfalls genau gezeigt werden; man war so in der Lage, mittels der Giftanalyse die einzelnen Fermentarten in den Fermentgemischen nachzuweisen[1]).

Gegen diese Versuche kann jedoch mit Recht der Einwand erhoben werden, daß die Reinigung der Fermente nicht weit genug ging[2]). Möglicherweise konnten ja erst bei einer viel höheren Stufe der Reinigung Unterschiede gegen das Verhalten des ungereinigten Ferments auftreten, die auf einer niedrigeren Stufe noch nicht manifest werden. Wir haben daher die Versuche mit verschiedenen Organlipasen noch einmal aufgenommen. Zunächst wurde die Magenlipase geprüft. Dieses Ferment war besonders geeignet, um die gestellten Fragen zu untersuchen, da sein Verhalten gegen Chinin genau studiert ist und über seine Reinigung und die Änderung des p_H-Optimums im Verlauf der Reinigung durch die Untersuchungen von *Willstätter*, *Haurowitz* und *Memmen* sehr genaue Angaben vorliegen.

Wir verfuhren in der Verarbeitung des Ferments genau nach den Vorschriften dieser Autoren. Die Mucosa der jeweiligen Tierart (untersucht wurden Kaninchen, Schwein, Hund, Rind und Schaf) wurde von der Muskularis abgetrennt, zerkleinert, zu einem Brei verrieben, 2 Stunden mit zweimal gewechseltem Aceton behandelt, nach Entfernung des Acetons noch einmal einige Minuten mit Aceton, dann einige Minuten mit gleichen Teilen Aceton—Äther behandelt; die Flüssigkeiten wurden abgegossen, das Organpulver wurde bis zum nächsten Tage getrocknet und dann gepulvert. — Die weitere Reinigung erfolgte wie bei *Willstätter*, *Haurowitz* und *Memmen* in mehreren Stufen: zuerst ammoniakalischer Auszug des getrockneten Organs, Essigsäurefällung, Elektrodialyse, zum Schluß Adsorption mit Kaolin und Elution mit Ammonphosphat. In den einzelnen Versuchen wurden stets 2 ccm Fermentlösung, 2 ccm Puffergemisch (m/3 primärer und sekundärer Phosphatlösung), 1 ccm Giftlösung (oder destilliertes Wasser) und 56 ccm gesättigter Tributyrinlösung angewandt. — In Übereinstimmung mit den genannten Autoren haben wir bei der Magenlipase vom Kaninchen eine Verschiebung des p_H-Optimums mit der Reinigung (nach der Elektrodialyse) finden können. Beim Schwein, dessen Magenlipase schon in ungereinigtem Zustande das Optimum im alkalischen Gebiete hat, ist eine Verschiebung nach der alkalischen Seite nur angedeutet.

Die auf verschiedene Reinheitsstufen gebrachten Lipasen wurden nun zunächst der Wirkung des Chinins (Chinin. hydrochlor) unterworfen. Entsprechend den früheren Befunden hemmte das Chinin die Wirkung

[1]) *P. Rona* und *H. Petow*, diese Zeitschr. **146**, 144, 1924.
[2]) Vgl. *Willstätter* und *Fr. Memmen*, l. c.

der Lipase sehr deutlich; unter den gegebenen Versuchsbedingungen 15 bis 20 mg Chinin. hydrochlor. (in 61 ccm Gesamtflüssigkeit) bei p_H 7 zu 50 bis 70 Proz., bei p_H 6 zu 45 Proz. Bei der höchsten Reinigungsstufe war die Giftwirkung noch immer stark, wenn auch gegen vorher etwas abgeschwächt, und zwar unter vergleichbaren Bedingungen bei p_H 7 bis 50 Proz., bei p_H 6 bis 27 Proz. Hemmung.

Kann man somit bei der Magenlipase des Kaninchens nur von einer Abschwächung der Giftwirkung mit der Reinigung reden, so war die Änderung der Giftwirkung mit zunehmender Reinheit der Magenlipase beim Schwein viel eingreifender. Bei ungereinigter Lipase fanden wir beim Schwein selbst bei hohen Chinindosen keine Hemmung, in manchen Fällen sogar eine schwache Förderung durch Chinin bis zu 10 bis 20 Proz. Nach vorangegangener Elektrodialyse und Kaolinreinigung stieg die Empfindlichkeit für Chinin bis zu einer Hemmung von 49 Proz. (bei p_H 7) bzw. bis 27 Proz. (bei p_H 6) unter den gegebenen Versuchsbedingungen. Wird die Schweinelipase nicht maximal gereinigt, vor allem weniger gründlich dialysiert, so ist keine Hemmung durch Chinin zu beobachten, oder sie ist sehr schwach. Es scheint demnach, daß erst durch gründliche Dialyse diejenigen Verbindungen entfernt werden, die die Chininwirkung vereiteln.

Mischt man nun die gereinigte Magenlipase vom Kaninchen mit der ungereinigten (bzw. schwach gereinigten) Magenlipase vom Schwein, so findet man wieder eine Addition der Wirkungen; falls Fermente gleich großer Wirksamkeit zusammengebracht werden, bleibt nach entsprechender Chininbehandlung nur die halbe Wirksamkeit übrig. Ebenso liegen die Verhältnisse, wenn man gereinigte und ungereinigte Magenlipase vom Kaninchen oder gereinigte und ungereinigte Magenlipase vom Schwein miteinander mischt und auf diese Fermentmischung Chinin wirken läßt.

Von anderen Tierarten wurden noch Rind, Schaf und Hund untersucht. Die Magenschleimhaut der beiden ersten Tierarten enthielt jedoch so wenig Lipase, daß eine merkliche Wirkung auf Tributyrin nicht zu beobachten war. Beim Hunde war die Abnahme der Hemmung durch Chinin nach erfolgter Reinigung noch weniger ausgesprochen als beim Kaninchen.

Die Versuche wurden nun auch auf die Lipasen der Leber und des Pankreas von Kaninchen, Schwein, Rind und Hammel ausgedehnt. (Nur bei der Rinderleber waren die Ausbeuten an Lipase so gering, daß eine Prüfung der Verhältnisse dieses Organs nicht möglich war.) Die Verarbeitung der Organe war wie bei der Magenschleimhaut. Verglichen wurde stets der schwach ammoniakalische Auszug der getrockneten und entfetteten Organe („ungereinigtes“ Ferment) mit der Fermentwirkung, die an dem Ferment nach voraufgegangener Reinigung

durch Essigsäurefällung, Elektrodialyse, Kaolinadsorption und Elution beobachtet wurde. Untersucht wurde stets bei p_H 7; die Zusammensetzung der Mischung war wie oben angegeben. Der angegebene Vergiftungsgrad wurde bei 16 mg Chinin. hydrochlor. (in 61 ccm) gefunden.

Was das Verhalten des „ungereinigten“ Ferments anlangt, so konnte das schon früher beobachtete entgegengesetzte Verhalten von Leber- und Pankreaslipase gegen Chinin und Atoxyl wiedergefunden werden. Während die Leberlipase von Kaninchen, Schwein, Hammel sich so gut wie unempfindlich gegen Chinin erwies, wird sie von Atoxyl ziemlich stark (bis zu 50 bis 60 Proz.) gehemmt[1]). Umgekehrt wird die Pankreaslipase aller der untersuchten Tierarten von Chinin stark (bis zu 50 Proz.), von Atoxyl gar nicht beeinflußt. Vergleicht man diese Verhältnisse mit den an hochgradig gereinigten Fermenten gewonnenen, so ergibt sich folgendes. Die Chininresistenz der Leberlipase bleibt entweder unverändert (wie beim Schwein) oder weicht einer geringgradigen Empfindlichkeit, wie beim Hammel und Kaninchen, wo Hemmungen bis 30 Proz. gefunden wurden. Hingegen erfuhr die Empfindlichkeit der Pankreaslipase gegen Chinin bei den untersuchten Tierarten eine unwesentliche Abschwächung auf etwa 40 Proz. Hemmung gegen etwa 50 Proz. vorher.

Was die Vergiftung mit Atoxyl anlangt, so blieb die Pankreaslipase nach wie vor der Reinigung refraktär gegen das Gift, hingegen wird die starke Empfindlichkeit der Leberlipase gegen Atoxyl sehr wesentlich (beim Kaninchen etwa 16 Proz., beim Hammel und Schwein etwa 30 Proz. Hemmung) vermindert. Auch hier finden wir demnach neben mehr oder weniger deutlich ausgesprochenen graduellen Unterschieden in der Giftwirkung vor und nach der Reinigung auch wesentliche Unterschiede in dem Verhalten dem Gifte gegenüber.

Versuche mit verschiedenen Strychninsalzen fügen zu dem Gesamtbild nichts Neues hinzu, sollen daher nicht näher mitgeteilt werden. Es sei nur erwähnt, daß das refraktäre Verhalten der Leber- und Pankreaslipase vom Kaninchen und Rinde in ungereinigtem Zustande einer mäßigen Empfindlichkeit (bis zu 25 Proz. Hemmung) im hochgereinigten Zustande weicht.

Mischt man wiederum die gereinigten oder die ungereinigten Fermente von abweichender Empfindlichkeit gegen ein Gift miteinander, so ist das individuelle Verhalten der einzelnen Fermente stets deutlich erkennbar, eine Beeinflussung des einen Ferments durch das andere findet demnach nicht statt.

Es besteht demnach eine „physiologische“ Organspezifität der Fermente, die mit der Giftanalyse nachgewiesen werden kann. Ein

---

[1]) Vgl. *P. Rona* und *R. Pavlović*, diese Zeitschr. **134**, 108, 1922.

Rückschluß auf die Spezifität der Fermente selbst auf Grund dieser Untersuchungen ist zumindest nicht zwingend. Andererseits haben die Untersuchungen von *Willstätter* gezeigt, daß selbst so nahe verwandte Fermente wie die Lipasen des Pankreas, der Leber, des Magens verschieden sein müssen, da diese eine untereinander verschiedene stereochemische Spezifität besitzen. Diese Befunde sprechen sehr eindringlich für eine sehr weitgehende Differenzierung der einzelnen Fermentarten.

Zusammenfassung.

Untersucht man das Verhalten der nach den *Willstätter*schen Vorschriften hochgradig gereinigten Lipasen der Magenschleimhaut, der Leber und des Pankreas von Kaninchen, Schwein, Rind, Hammel, Hund, gegen Chinin und Atoxyl und vergleicht es mit dem Verhalten ungereinigten bzw. wenig gereinigten Ferments, so findet man in vielen Fällen nur einen qualitativen, mehr oder weniger deutlich ausgesprochenen Unterschied in dem Sinne, daß das gereinigte Ferment gegen das Gift etwas weniger empfindlich ist als in ungereinigtem Zustande. In dieser Weise verhalten sich die Magenlipase vom Kaninchen und vom Hunde oder die Pankreaslipase vom Kaninchen, Rind, Hammel, Schwein. In einzelnen Fällen sind die Unterschiede jedoch tiefgreifender, indem das Verhalten des Ferments dem Gift gegenüber sich wesentlich ändert. So wird die ungereinigt gegen Chinin refraktäre Magenlipase vom Schwein nach weitgehender Reinigung gegen dieses Alkaloid sehr empfindlich, während die gegen Atoxyl im ungereinigten Zustande sehr empfindliche Leberlipase vom Kaninchen in stark gereinigtem Zustande gegen Atoxyl fast unempfindlich ist. Mischt man die einzelnen Fermentarten, die sich gegen ein Gift different verhalten, und behandelt man die Mischung mit dem betreffenden Gift, so behält jedes Ferment in der Mischung seine Eigenart dem Gifte gegenüber bei. Die Begleitstoffe der einzelnen Fermente, die die Giftwirkung wesentlich beeinflussen, müssen sehr fest mit dem betreffenden Ferment verankert sein.

Auszug aus den Protokollen.

Zusammensetzung in allen Versuchen: 2 ccm Fermentlösung, 1 ccm der Giftlösung (oder destilliertes Wasser), 2 ccm Pufferlösung (m/3 Phosphatlösung), 56 ccm gesättigte wässerige Tributyrinlösung. Die Konstanten der fermentativen Spaltung (berechnet nach der monomolekularen Reaktion) sind mit 10^3 multipliziert angegeben; die den Konstanten beigegebenen Indizes bedeuten Milligramme des betreffenden Giftes in 61 ccm Gesamtflüssigkeit. Die in den Klammern angegebenen Zahlen bedeuten die prozentische Hemmung unter der Einwirkung des im Gemisch vorhandenen Giftes. Reinigung 4. Stufe bedeutet: Elution aus der Kaolinadsorption nach vorheriger Reinigung durch Essigsäurefällung und Elektrodialyse.

Versuch 1. Kaninchenmagenlipase, ungereinigt. Chininwirkung. p_H 6,05. Untersuchung sofort nach der Vermischung Ferment—Chinin k_0 7,60, k_1 7,31 (3,8 Proz.), k_5 5,74 (24,5 Proz.), k_{10} 5,00 (34,2 Proz.), k_{20} 4,19 (44,7 Proz.). — 1 Stunde nach Mischung Ferment—Gift k_1 7,25 (4,9 Proz.), k_5 5,83 (23,3 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_1 6,39 (15,8 Proz.), k_5 5,76 (24,2 Proz.), k_{10} 5,31 (30,1 Proz.). — Dasselbe bei p_H 7,06. — Direkt nach der Mischung k_0 5,36, k_1 5,14 (4,1 Proz.), k_5 3,79 (29,2 Proz.), k_{10} 2,86 (46,4 Proz.), k_{20} 2,11 (60,6 Proz.). — 1 Stunde nach der Mischung k_1 4,80 (10,5 Proz.), k_5 3,43 (36,0 Proz.), k_{10} 2,74 (48,9 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_1 4,80 (10,5 Proz.), k_5 3,43 (36,0 Proz.), k_{10} 2,55 (52,4 Proz.).

Versuch 2. Kaninchen. Magenlipase, gereinigt (4. Stufe). Chininwirkung. p_H 6,08. — Sofort nach der Mischung k_0 7,49, k_1 7,49, k_5 7,08 (5,4 Proz.), k_{10} 6,57 (12,3 Proz.), k_{20} 6,10 (18,5 Proz.). — 1 Stunde nach der Mischung k_5 6,65 (11,2 Proz.), k_{10} 5,92 (20,9 Proz.), k_{20} 5,06 (32,4 Proz.). — 2½ Stunden nach der Mischung k_5 6,43 (14,1 Proz.), k_{10} 5,77 (22,8 Proz.), k_{20} 5,01 (33,1 Proz.). — p_H 7,00. Sofort nach der Mischung k_0 8,15, k_1 7,74 (5,0 Proz.), k_5 6,25 (23,3 Proz.), k_{10} 5,39 (33,8 Proz.), k_{20} 4,64 (43,1 Proz.). — ½ Stunde nach der Mischung k_5 6,15 (24,5 Proz.), k_{10} 5,38 (34,0 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_5 5,83 (28,4 Proz.), k_{10} 5,00 (38,6 Proz.), k_{20} 4,37 (46,3 Proz.).

Versuch 3. Kaninchen. Magenlipase, ungereinigt. Chininwirkung. p_H 7,06. — 1 Stunde nach der Mischung k_0 5,36, k_1 4,80 (10,5 Proz.), k_5 3,43 (36,0 Proz.), k_{10} 2,74 (48,9 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung p_H 7,06, k_0 5,36, k_1 4,80 (10,5 Proz.), k_5 3,43 (36,0 Proz.), k_{10} 2,55 (52,4 Proz.). — p_H 6,05. 1 Stunde nach der Mischung k_0 7,60, k_1 7,25 (4,9 Proz.), k_5 5,83 (23,3 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_0 7,60, k_1 6,39 (15,8 Proz.), k_5 5,76 (24,2 Proz.), k_{10} 5,31 (30,1 Proz.).

Versuch 4. Kaninchen. Magenlipase, gereinigt (4. Stufe). Chininwirkung. p_H 7,00. Sofort nach der Mischung k_0 8,15, k_5 6,15 (24,5 Proz.), k_{10} 5,38 (34,0 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_0 8,15, k_5 5,83 (28,4 Proz.), k_{10} 5,00 (38,6 Proz.), k_{20} 4,37 (46,3 Proz.). — p_H 6,08. 1 Stunde nach der Mischung k_0 7,49, k_5 6,65 (11,2 Proz.), k_{10} 5,92 (20,9 Proz.), k_{20} 5,06 (32,4 Proz.).

Versuch 5. Kaninchenmagenlipase, ungereinigt. Chininwirkung. p_H 6,03. — k_0 6,76, k_1 6,14 (9,2 Proz.), k_5 5,47 (19,1 Proz.), k_{10} 4,54 (32,8 Proz.), k_{20} 3,87 (42,8 Proz.). — ½ Stunde nach der Mischung k_{20} 3,67 (45,7 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_{20} 3,40 (49,7 Proz.). — p_H 7,05. k_0 4,51, k_1 3,75 (16,8 Proz.), k_5 3,17 (29,7 Proz.), k_{10} 2,67 (40,8 Proz.), k_{20} 2,26 (50,0 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_{10} 2,26 (50,0 Proz.), k_{20} 1,92 (57,4 Proz.).

Versuch 6. Kaninchenmagenlipase, gereinigt (4. Stufe). Chininwirkung. p_H 7,10. — Sofort nach der Mischung k_0 8,11, k_1 7,24 (10,7 Proz.), k_5 6,39 (21,2 Proz.), k_{10} 5,19 (36,0 Proz.), k_{20} 4,43 (45,4 Proz.). — 1 Stunde nach der Mischung k_0 8,11, k_1 7,18 (11,5 Proz.), k_5 6,16 (24,0 Proz.), k_{10} 4,91 (39,4 Proz.), k_{20} 4,23 (47,7 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_1 7,20 (11,2 Proz.), k_5 6,31 (22,2 Proz.), k_{10} 4,80 (40,8 Proz.), k_{20} 4,14 (48,9 Proz.).

Versuch 7. Schweinemagenlipase, ungereinigt. Chininwirkung. p_H 6,10. Sofort nach der Mischung k_0 6,54, k_1 6,54, k_{5-20} 7,08 (8,2 Proz. Aktivierung). — 1 Stunde nach der Mischung, wie sofort nach der Mischung. — 2 Stunden nach der Mischung k_1 bis k_{20} 6,17 (5,6 Proz.). p_H 7,04. — Sofort nach der Mischung k_0 7,97, k_{1-20} 7,97. — 1 Stunde nach der Mischung, wie sofort. — 2 Stunden nach der Mischung k_{1-10} 7,97, k_{20} 7,41 (7,0 Proz.).

Versuch 8. Schweinemagenlipase, gereinigt (4. Stufe). Chininwirkung. p_H 6,08. — k_0 6,35, k_{1-5} 6,35, k_{10} 5,71 (10,1 Proz.), k_{20} 5,41 (14,8 Proz.). — 1 Stunde nach der Mischung k_1 5,56 (12,4 Proz.), k_{10} 4,74 (25,3 Proz.), k_{20} 4,24 (33,2 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_1 5,82 (8,3 Proz.), k_5 4,56 (28,2 Proz.), k_{10} 3,96 (37,6 Proz.), k_{20} 3,96 (37,6 Proz.). p_H 7,00. Sofort nach der Mischung k_0 7,93, k_1 7,93, k_5 7,32 (7,8 Proz.), k_{10} 6,22 (21,6 Proz.), k_{20} 4,85 (38,8 Proz.). — 1 Stunde nach der Mischung k_1 6,27 (20,9 Proz.), k_5 4,80 (30,9 Proz.), k_{10} 4,05 (40,8 Proz.), k_{20} 3,85 (51,8 Proz.). — 2 Stunden nach der Mischung k_1 5,86 (26,1 Proz.), k_5 4,75 (40,1 Proz.), k_{10} 3,71 (53,2 Proz.).

Versuch 9. Schweinemagenlipase, ungereinigt. Chininwirkung. p_H 6,98. Sofort nach der Mischung k_0 7,77, k_{5-10} 9,52 (Aktivierung), k_{20} 7,52 (2,9 Proz.). — 1 Stunde nach der Mischung k_{5-10} 9,25 (19,0 Proz. Aktivierung), k_{20} 7,52 (2,9 Proz.).

Versuch 10. Schweinemagenlipase, gereinigt (4. Stufe). Chininwirkung. p_H 6,98. Sofort nach der Mischung k_0 6,98, k_1 6,75 (3,3 Proz.), k_5 6,12 (12,3 Proz.), k_{10} 5,70 (18,3 Proz.), k_{20} 4,19 (40,0 Proz.). — 1 Stunde nach der Mischung k_5 6,11 (12,5 Proz.), k_{10} 5,58 (20,1 Proz.), k_{20} 3,65 (47,7 Proz.).

Versuch 11. Mischung von ungereinigter Magenlipase vom Kaninchen und vom Schwein. Chininversuch. p_H 6,99. — F(erment) vom Kaninchen 0,5 ccm, oder F(erment) vom Schwein 0,5 ccm, oder Ferment vom Schwein 0,5 ccm + 10 mg Chinin. hydrochl. k 4,57; F(erment) vom Kaninchen 0,5 ccm + F(erment) vom Schwein 0,5 ccm + 10 mg Chinin. hydrochl. k 5,09. — Kaninchen-F 1,0 ccm oder Schweine-F 1,0 ccm, oder Kaninchen-F + Schweine-F je 0,5 ccm k 7,51; Schweine-F 1,0 ccm + 10 mg Chinin. hydrochl. 8,29.

Versuch 12. Mischung von ungereinigter Magenlipase vom Kaninchen und vom Schwein. Ch(inin)versuch. p_H 6,98. Kaninchen-F 0,5 ccm oder Schweine-F 0,5 ccm k 4,51; Schweine-F 0,5 ccm + 20 mg Ch(inin) k 4,10; Kaninchen-F 0,5 ccm + Schweine-F 0,5 ccm + 20 mg Ch k 4,35. — Kaninchen-F 1,0 ccm oder Schweine-F 1,0 ccm oder Kaninchen-F 0,5 ccm + Schweine-F 0,5 ccm oder Schweine-F 1,0 ccm + 20 mg Ch k 7,50.

Versuch 13. Mischung von ungereinigter Magenlipase vom K(aninchen) und vom Sch(wein). Ch(inin)versuch. p_H 6,98. — K-F 0,5 ccm oder Sch-F 0,5 ccm oder Sch-F 0,5 ccm + 10 mg Ch oder K-F 0,5 ccm + Schw-F 0,5 ccm + 10 mg Ch k 4,70. — K-F 1,0 ccm oder Sch-F 1,0 ccm oder K-F 0,5 ccm + Sch-F 0,5 ccm oder Sch-F 1,0 ccm + 10 mg Ch k 7,80.

Versuch 14. Mischung von gereinigter Magenlipase vom Kaninchen und halb gereinigter Magenlipase vom Schwein. p_H 7,07. — K-F 0,5 ccm oder Sch-F 0,5 ccm oder Sch-F 0,5 ccm + 6 mg Ch k 3,30. — K-F 0,5 ccm + Sch-F 0,5 ccm + 6 mg Ch k 5,61. — K-F 0,5 ccm + 6 mg Ch k 2,66.

K-F 1,0 ccm + 6 mg Ch k 4,33. — K-F 1,0 ccm oder Sch-F 1,0 ccm oder K-F 1,0 ccm + Sch-F 1,0 ccm + 6 mg Ch oder K-F 0,5 ccm + Sch-F 0,5 ccm k 6,80.

Versuch 15. Mischung von gereinigter Magenlipase vom Kaninchen und halb gereinigter Magenlipase vom Schwein. p_H 7,04. — K-F 0,5 ccm + oder Sch-F 0,5 ccm oder Sch-F 0,5 ccm + 6 mg Ch k 3,30. — K-F 0,5 ccm + 6 mg Ch k 2,61. — K-F 0,5 ccm + Sch-F 0,5 ccm + 6 mg Ch k 5,15.

K-F 1,0 ccm oder Sch-F 1,0 ccm oder K-F 0,5 ccm + Sch-F 0,5 ccm oder Sch-F 1,0 ccm + 6 mg Ch k 6,85.

Versuch 16. Chininversuch. Kaninchenleberlipase, ungereinigt, gegen Ch refraktär. Gereinigt (4. Stufe). p_H 6,99. — k_0 8,53, k_1 8,21 (3,7 Proz.), k_4 7,64 (10,4 Proz.), k_8 7,02 (17,4 Proz.), k_{16} 5,99 (29,8 Proz.).

Versuch 17. Chininversuch. Kaninchenleberlipase, gereinigt (4. Stufe). p_H 6,99. — k_0 8,72, k_1 8,20 (5,9 Proz.), k_4 7,52 (13,8 Proz.), k_8 6,86 (21,3 Proz.), k_{16} 5,82 (33,2 Proz.).

Versuch 18. Atoxylversuch. Kaninchenleberlipase, ungereinigt. p_H 7,12. — k_0 7,54, k_1 6,15 (18,4 Proz.), k_4 5,15 (31,7 Proz.), k_8 3,85 (48,9 Proz.), k_{16} 3,07 (59,3 Proz.).

Versuch 19. Atoxylversuch. Kaninchenleberlipase, ungereinigt. p_H 7,12. — k_0 7,66, k_1 6,32 (17,5 Proz.), k_4 5,30 (30,8 Proz.), k_8 4,20 (45,2 Proz.), k_{16} 3,45 (55,0 Proz.).

Versuch 20. Atoxylversuch. Kaninchenleberlipase, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,04. — k_{0-4} 8,64, k_8 7,65 (9,0 Proz.), k_{16} 6,92 (17,7 Proz.).

Versuch 21. Atoxylversuch. Kaninchenleberlipase, gereinigt (4. Stufe). p_H 6,99. — k_{0-8} 7,64, k_{16} 6,39 (16,4 Proz.).

Versuch 22. Chininversuch. Kaninchenpankreaslipase, ungereinigt. p_H 7,05. — k_0 7,38, k_1 6,55 (11,1 Proz.), k_4 5,74 (22,2 Proz.), k_8 5,05 (31,4 Proz.), k_{16} 4,18 (44,5 Proz.).

Versuch 23. Chininversuch. Kaninchenpankreaslipase, ungereinigt. p_H 7,05. — k_0 7,60, k_1 6,85 (9,8 Proz.), k_4 5,95 (21,7 Proz.), k_8 5,14 (32,4 Proz.), k_{16} 4,32 (43,2 Proz.).

Versuch 24. Chininversuch. Kaninchenpankreaslipase, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,00. — k_0 8,24, k_1 7,44 (9,7 Proz.), k_4 6,50 (21,1 Proz.), k_8 5,73 (30,5 Proz.), k_{16} 4,97 (39,6 Proz.).

Versuch 25. Strychninversuch (Strychn. sulf.). Kaninchenpankreaslipase, ungereinigt, gegen das Gift refraktär. Gereinigt (4. Stufe). p_H 7,00. — k_{0-1} 8,04, k_4 7,72 (4,0 Proz.), k_8 7,18 (10,7 Proz.), k_{16} 6,41 (20,3 Proz.).

Versuch 26. Strychninversuch (Strychn. sulf.). Kaninchenleberlipase, ungereinigt, refraktär. Gereinigt (p_H 7,04). — k_0 7,64, k_4 7,05 (7,6 Proz.), k_8 6,36 (16,7 Proz.), k_{16} 5,63 (26,3 Proz.).

Versuch 26. Chininversuch. Schweineleberlipase, ungereinigt, gegen Ch refraktär. Gereinigt (4. Stufe). p_H 7,0. — k_0 5,12, k_4 6,09 (18,9 Proz. aktiviert), k_{8-16} 6,81 (33 Proz. aktiviert).

Versuch 27. Atoxylversuch. Schweineleberlipase, ungereinigt. p_H 6,95. — k_0 7,42, k_1 6,66 (10,2 Proz.), k_4 5,89 (20,6 Proz.), k_8 4,57 (38,4 Proz.), k_{16} 3,54 (52,3 Proz.).

Versuch 28. Atoxylversuch. Schweineleberlipase, ungereinigt. p_H 6,95. — k_0 7,41, k_1 6,60, (10,9 Proz.), k_4 5,67 (23,4 Proz.), k_8 6,68 (36,8 Proz.), k_{16} 3,66 (50,6 Proz.).

Versuch 29. Atoxylversuch. Schweineleberlipase, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,09. — k_0 6,05, k_1 6,05, k_4 5,65 (6,6 Proz.), k_8 5,14 (15,0 Proz.), k_{16} 4,63 (23,5 Proz.).

Versuch 30. Strychninversuch (Strychnin. jodic.). Schweineleber, ungereinigt. p_H 6,97. — k_0 7,62, k_1 6,00 (21,3 Proz.), k_4 4,56 (40,2 Proz.), k_8 3,77 (50,5 Proz.), k_{16} 2,50 (67,2 Proz.).

Versuch 31. Strychninversuch (Strychnin. jodic.). Schweineleber, gereinigt. p_H 7,07. — k_0 8,00, k_4 7,25 (9,4 Proz.), k_8 6,49 (18,9 Proz.), k_{16} 6,11 (23,6 Proz.).

Versuch 32. Chininversuch. Schweinepankreas, ungereinigt. p_H 7,04. k_0 7,27, k_1 6,46 (11,1 Proz.), k_4 5,58 (23,2 Proz.), k_8 4,43 (39,2 Proz.), k_{16} 3,61 (50,3 Proz.).

Versuch 33. Chininversuch. Schweinepankreas, ungereinigt. p_H 7,04. — k_0 8,92, k_1 8,05 (9,8 Proz.), k_4 7,28 (17,1 Proz.), k_8 6,24 (30,0 Proz.), k_{16} 5,19 (41,8 Proz.).

Versuch 34. Chininversuch. Schweinepankreas, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,02. — k_0 7,27, k_1 6,90 (5,1 Proz.), k_4 6,36 (12,5 Proz.), k_8 5,64 (22,4 Proz.), k_{16} 4,67 (35,8 Proz.).

Versuch 35. Chininversuch. Schweinepankreas, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,02. — k_{0-1} 10,31, k_4 9,30 (9,8 Proz.), k_8 8,58 (16,8 Proz.), k_{16} 7,53 (26,8 Proz.).

Versuch 36. Chininversuch. Schweinepankreas, ungereinigt. p_H 7,04. — k_0 7,84, k_1 7,05 (10,1 Proz.), k_4 6,12 (21,9 Proz.), k_8 5,06 (35,5 Proz.), k_{16} 4,17 (46,8 Proz.).

Versuch 37. Strychninversuch (Strychnin. jodic.). Schweinepankreas, ungereinigt, ist strychninunempfindlich. Gereinigt (4. Stufe). k_{0-8} 6,79, k_{16} 6,07 (10,6 Proz.).

Versuch 38. Chininversuch. Rinderpankreas, ungereinigt. p_H 7,07. — k_0 9,81, k_1 8,35 (14,8 Proz.), k_4 6,70 (31,7 Proz.), k_8 5,30 (45,9 Proz.), k_{16} 4,28 (56,2 Proz.).

Versuch 39. Chininversuch. Rinderpankreas, ungereinigt. p_H 7,07. — k_0 10,20, k_1 8,30 (18,6 Proz.), k_4 6,24 (38,8 Proz.), k_8 4,86 (52,3 Proz.), k_{16} 3,76 (63,1 Proz.).

Versuch 40. Chininversuch. Rinderpankreas, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,11. — k_0 8,16, k_1 7,24 (11,3 Proz.), k_4 6,20 (24,0 Proz.), k_8 5,57 (31,7 Proz.), k_{16} 4,84 (40,7 Proz.).

Versuch 41. Chininversuch. Rinderpankreas, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,11. — k_0 8,10, k_1 7,35 (9,7 Proz.), k_4 6,31 (22,0 Proz.), k_8 5,57 (31,2 Proz.), k_{16} 4,98 (38,5 Proz.).

Versuch 42. Chininversuch. Rinderpankreas, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,11. — k_0 8,16, k_1 7,24 (11,3 Proz.), k_4 6,20 (24,0 Proz.), k_8 5,57 (31,7 Proz.), k_{16} 4,84 (40,7 Proz.).

Versuch 43. Atoxylversuch. Rinderpankreas, gereinigt wie ungereinigt, gegen Atoxyl unempfindlich.

Versuch 44. Strychninversuch (Strychnin. jodic.). Rinderpankreas, ungereinigt. p_H 7,07. — k_0 9,22, k_1 8,29 (10,1 Proz.), k_4 7,11 (22,9 Proz.), k_8 6,02 (34,7 Proz.), k_{16} 5,16 (44,1 Proz.).

Versuch 45. Strychninversuch (Strychnin. jodic.). Rinderpankreas, gereinigt. p_H 7,11. — k_0 6,48, k_8 5,88 (9,2 Proz.), k_{16} 5,47 (15,6 Proz.).

Versuch 46. Chininversuch. Hammelleberlipase, ungereinigt, ist gegen Chinin unempfindlich. Gereinigt (4. Stufe). p_H 7,12. — k_0 7,14, k_4 6,27 (12,2 Proz.), k_{16} 5,56 (22,1 Proz.).

Versuch 47. Chininversuch. Hammelleberlipase, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,12. — k_0 6,95, k_4 6,24 (10,2 Proz.), k_8 5,81 (16,4 Proz.), k_{16} 5,43 (21,9 Proz.).

Versuch 48. Chininversuch. Hammelpankreaslipase, ungereinigt. p_H 7,14. — k_0 9,73, k_1 9,00 (7,5 Proz.), k_4 8,23 (15,4 Proz.), k_8 6,94 (28,6 Proz.), k_{16} 5,62 (42,2 Proz.).

Versuch 49. Chininversuch. Hammelpankreaslipase, ungereinigt. p_H 7,14. — k_0 9,98, k_1 9,27 (7,2 Proz.), k_4 8,08 (19,1 Proz.), k_8 6,75 (32,4 Proz.), k_{16} 5,44 (45,5 Proz.).

Versuch 50. Chininversuch. Hammelpankreaslipase, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,10. — k_0 8,30, k_1 7,99 (3,7 Proz.), k_4 7,02 (15,4 Proz.), k_8 6,29 (24,4 Proz.), k_{16} 5,34 (35,6 Proz.).

Versuch 51. Chininversuch. Hammelpankreaslipase, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,10. — k_0 8,37, k_1 8,01 (4,2 Proz.), k_4 7,46 (10,9 Proz.), k_8 6,24 (25,4 Proz.), k_{16} 5,04 (39,9 Proz.).

Versuch 52. Atoxylversuch. Hammelpankreaslipase, gereinigt wie ungereinigt, ist gegen Atoxyl unempfindlich.

Versuch 53. Strychninversuch (Strychnin. sulf.). Hammelpankreaslipase, ungereinigt, gegen Strychnin unempfindlich. Gereinigt. p_H 7,10. — k_{0-1} 8,77, k_4 8,17 (6,9 Proz.), k_8 7,43 (15,3 Proz.), k_{16} 6,71 (23,5 Proz.).

Versuch 54. Strychninversuch (Strychnin. sulf.). Hammelpankreaslipase, gereinigt. p_H 7,10. — k_{0-1} 9,01, k_4 8,20 (8,9 Proz.), k_8 7,69 (14,5 Proz.), k_{16} 6,99 (22,4 Proz.).

Versuch 55. Atoxylversuch. Hammelleberlipase, ungereinigt. p_H 7,04. — k_0 8,18, k_1 6,79 (16,9 Proz.), k_4 5,94 (27,4 Proz.), k_8 5,25 (35,8 Proz.), k_{16} 4,67 (42,7 Proz.).

Versuch 56. Atoxylversuch. Hammelleber, ungereinigt. p_H 7,04. — k_0 8,55, k_1 7,08 (10,2 Proz.), k_4 6,03 (29,0 Proz.), k_8 5,35 (37,2 Proz.), k_{16} 4,62 (45,9 Proz.).

Versuch 57. Atoxylversuch. Hammelleber, gereinigt. p_H 7,12. — k_0 7,21, k_4 6,28 (12,9 Proz.), k_8 5,59 (22,5 Proz.), k_{16} 5,06 (29,8 Proz.).

Versuch 58. Strychninversuch (Strychnin. sulf.). Hammelleber, ungereinigt, ist gegen Strychnin unempfindlich. Gereinigt (4. Stufe). p_H 7,09. — k_0 7,42, k_4 6,81 (8,2 Proz.), k_8 6,16 (16,9 Proz.), k_{16} 5,06 (31,8 Proz.).

Versuch 59. Strychninversuch (Strychnin. sulf.). Hammelleber, gereinigt (4. Stufe). p_H 7,09. — k_0 7,62, k_4 6,87 (9,9 Proz.), k_8 5,95 (21,9 Proz.), k_{16} 5,01 (34,3 Proz.).

Versuch 60. Mischungsversuch von ungereinigter P(ankreas)- und L(eberlipase) vom Schwein gegen A(toxyl) (10 mg). p_H 7,07. — P-F(erment) 0,5 ccm oder L-F 0,5 ccm, oder P-F 0,5 ccm + Atoxyl k 3,04. — P-F 0,5 ccm + P-F 0,5 ccm + Atoxyl k 4,76. — L-F 0,5 ccm + Atoxyl k 1,71.

P-F 1,0 ccm oder L-F 1,0 ccm oder P-F + L-F je 0,5 ccm, oder P-F 1,0 ccm + Atoxyl k 7,0; L-F 1,0 ccm + Atoxyl k 3,93.

Versuch 61. Mischungsversuch von ungereinigter P(ankreas)- und L(eber)lipase vom Schwein gegen Chinin (10 mg). p_H 7,0. — P-F 0,5 ccm oder L-F 0,5 ccm oder L-F 0,5 ccm + Chin. k 2,93. — P-F 0,5 ccm + Chinin k 1,95. — P-F 0,5 ccm + L-F 0,5 ccm + Chinin k 5,50.

P-F 1,0 ccm, oder L-F 1,0 ccm oder L-F 0,5 ccm + P-F 0,5 ccm, oder L-F 1,0 ccm + Chinin k 7,0.

Versuch 62. Mischungsversuch von gereinigter P(ankreas)- und L(eber)-lipase vom Schwein gegen Atoxyl (10 mg). p_H 7,11. — P-F 0,5 ccm oder L-F 0,5 ccm oder P-F 0,5 ccm + Atoxyl k 4,0. — L-F 0,5 ccm + Atoxyl k 3,44. — P-F 0,5 ccm + L-F 0,5 ccm + Atoxyl k 6,80.

P-F 1,0 ccm oder L-F 1,0 ccm oder P-F 0,5 ccm + L-F 0,5 ccm oder P-F 1,0 ccm + Atoxyl k 8,02.

Versuch 63. Mischungsversuch von gereinigter Leberlipase vom K(aninchen) und vom Sch(wein) gegen Chinin (10 mg). p_H 7,07. — K-F 0,5 ccm oder Sch-F 0,5 ccm oder Sch-F 0,5 ccm + Chinin k 3,04. — K-F 0.5 ccm + Chinin k 1,64. — K-F 0,5 ccm + Sch-F 0,5 ccm + Chinin k 5,0.

K-F 1,0 ccm + Chinin k 4,03, K-F 1,0 ccm oder Sch-F 1,0 ccm, oder Sch-F 1,0 ccm + Chinin k 6,40.

Über den Einfluß der Temperatur auf die koagulierende Wirkung einiger Alkalisalze auf das Pflanzenplasma. VIII.

Von

Hugo Kaho.

[Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des botanischen Instituts der Universität Tartu (Dorpat).]

(Eingegangen am 22. Oktober 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Ich habe die koagulierende (tödliche) Wirkung der Neutralsalze auf das Pflanzenplasma bei konstanter Temperatur untersucht[1]). Diese Temperatur war in den meisten Fällen eine gewöhnliche Zimmertemperatur. In der vorliegenden Mitteilung werde ich über den Einfluß derjenigen Temperaturen (0 bis 36°), die für das Leben noch nicht gefährlich sind, auf die tödliche Wirkung der Salze auf das Pflanzenplasma berichten.

Versuche.

Zu den Versuchen dienten die Flächenschnitte der Blattepidermis von Rotkohl (Blattoberseite) und bei wenigen Versuchen von Rhoeo discolor (Blattunterseite). Es wurden in die zu untersuchenden Lösungen über 100 gleiche kleine viereckige Schnitte gebracht und in gewissen Zeitabschnitten (s. Tabellen) je zehn Schnitte herausgenommen und das Prozent der lebenden Zellen durch die Plasmolyse bestimmt. Alle Schnitte, die bei einem Versuch verwandt wurden, stammten von demselben Blatt.

Die Lösungen wurden aus den *Kahlbaum*schen Präparaten („Zur Analyse") hergestellt.

Es wurde die Salzwirkung bei fünf bis sechs verschiedenen Temperaturen, die in den Tabellen angegeben sind, geprüft. Alle Probierzylinder (außer dem bei 0°) mit den Lösungen wurden in Schalen gestellt, die mit Wasser (1 Liter) gefüllt waren, um den Temperaturschwankungen vorzubeugen.

Die niedrigste Temperatur 0° wurde durch das Einstecken des Probierzylinders in den schmelzenden Schnee erzielt, in einem Raume, dessen Temperatur zwischen 3 bis 5° schwankte.

Eine Schale mit Wasser in demselben Raume diente zur Herstellung der Temperatur von 3 bis 5°. In gleicher Weise wurden in anderen Räumen die Temperaturen 8 bis 9°, 12 bis 13° usw. erhalten.

Für die bei den Versuchen höchste Temperatur 35 bis 36° diente ein Thermostat.

Dadurch, daß die Salzlösungen in genügend große Wassermengen eingetaucht waren, waren die Temperaturschwankungen ziemlich klein,

---

[1]) Diese Zeitschr. **120**, 125, 1921; Acta et Comm. Univ. Dorpat, A., **5**, 4, 1924.

durchschnittlich etwa 1°, in Ausnahmefällen 1½ bis 2°. Im letzteren Falle wurde die Temperatur durch Zugießen von kälterem bzw. wärmerem Wasser sofort reguliert.

Tabelle I. Versuchspflanze: Rotkohl.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	Temperatur in °C				
	35—36	22—23	12—13	4—5	0
			KNO_3 0,8 Mol.		
30 Min.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 Std.	85,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 Std. 30 Min.	85,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 Stdn.	50,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 Stdn. 30 Min.	75,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3 Stdn.	37,5	100,0	100,0	100,0	100,0
3 Stdn. 30 Min.	25,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4 Stdn.	17,5	100,0	100,0	100,0	100,0
5 „	2,5	92,5	100,0	100,0	100,0
6 „	0	95,0	100,0	100,0	100,0
16,5 „	—	30,0	80,0	100,0	100,0
18 „	—	5,0	90,0	100,0	100,0
20 „	—	2,5	87,5	100,0	100,0
24 „	—	0	92,5	100,0	100,0
40 „	—	—	45,0	97,5	100,0
48 „	—	—	45,0	90,0	100,0

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Die Tabelle I zeigt, daß die koagulierende Wirkung des K-Nitrats bei allen untersuchten Temperaturen eine verschiedene ist. Bei 35 bis 36° beginnt das Absterben der Zellen nach 30 Minuten, die Prozentzahl der lebenden Zellen in den Schnitten nimmt fast regelmäßig ab, bis nach etwa 5 Stunden alle Zellen absterben.

Bei 22 bis 23° beginnt das Absterben der Zellen erst nach 5stündigem Aufenthalt in der Lösung und dauert bis zu 24 Stunden.

Bei 12 bis 13° sind nach 48 Stunden noch 45 Proz. der Zellen am Leben, das Absterben beginnt hier etwa nach 10 Stunden, während bei 4 bis 5° erst nach 24stündigem Aufenthalt der Schnitte in den Lösungen eine unbeträchtliche Anzahl der Zellen geschädigt wird.

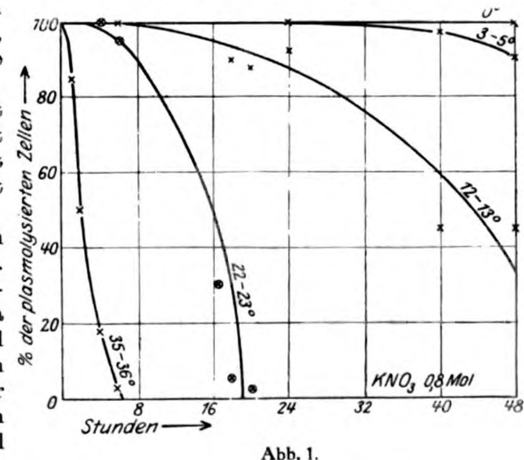


Abb. 1.

Bei 0° sind alle Schnitte im Laufe von 48 Stunden intakt.

Wir sehen also, wie die koagulierende Wirkung des Salzes in der Richtung von den niederen Temperaturen zu höheren fast regelmäßig zunimmt.

Es sei hier darauf hingewiesen, daß das Rotkohlplasma eine sehr große Widerstandsfähigkeit gegen die Salze besitzt.

Die Kurven der Abb. 1 veranschaulichen uns die Daten der Tabelle I.

Ungefähr dieselben Resultate ergaben andere Kaliumsalze, die nicht giftiger sind als das Nitrat. Es seien hier noch die Versuche mit Kaliumchlorid und -sulfat angeführt.

Tabelle II.

Versuchspflanze: Rotkohl.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	Temperatur in °C					
	35—36	22—23	12—13	8—9	3—4	0
			KCl 0,8 Mol.			
1 Std.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
14 Stdn.	5,0	70,0	100,0	100,0	100,0	100,0
15 „	0	40,0	100,0	100,0	100,0	100,0
17 „	—	40,0	92,5	92,5	100,0	100,0
18 „	—	22,5	67,5	92,5	100,0	100,0
20 „	—	5,0	67,5	90,0	100,0	100,0
23 „	—	0	10,0	57,5	100,0	100,0
27 „	—	—	5,0	52,5	100,0	100,0
38 „	—	—	0	20,0	70,0	100,0
40 „	—	—	—	17,5	50,0	100,0
45 „	—	—	—	2,5	35,0	100,0
49 „	—	—	—	0	30,0	100,0
62 „	—	—	—	—	12,5	75,0
67 „	—	—	—	—	0	67,5
			K_2SO_4 0,8 Mol.			
1 Std.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
14 Stdn.	2,5	35,0	92,5	100,0	100,0	100,0
16 „	0	7,5	87,5	100,0	100,0	100,0
18 „	—	5,0	50,0	92,5	100,0	100,0
20 „	—	2,5	45,0	87,5	100,0	100,0
23 „	—	0	25,0	82,5	100,0	100,0
27 „	—	—	17,0	77,5	100,0	100,0
38 „	—	—	12,5	52,5	100,0	100,0
40 „	—	—	0	42,5	92,5	100,0
45 „	—	—	—	10,0	90,0	100,0
49 „	—	—	—	0	77,5	100,0
62 „	—	—	—	—	37,5	95,0
67 „	—	—	—	—	5,0	55,0

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Die koagulierende Wirkung beider Salze (Tabelle II) wird durch die Temperatur in ziemlich gleicher Weise beeinflußt. Bei 35 bis 36° starben in beiden Lösungen die Zellen im Laufe von 14 Stunden ab.

Bei 22 bis 23° geht das Absterben am Anfang in K-Sulfat etwas schneller als in -chlorid, doch sind nach 20 Stunden in keiner Lösung mehr lebende Zellen vorhanden.

Bei 12 bis 13° ist die tödliche Wirkung der Lösung schon viel schwächer, die letzten Zellen sterben in den Schnitten nach 27 bzw. 38 Stunden ab.

Bei 3 bis 4° beginnt das Absterben der Zellen erst nach 27 bzw. 38 Stunden, während bei 0° erst am Ende des Versuchs Schädigungen in den Schnitten vorkommen.

Somit zeigt sich in den angeführten Versuchen eine sehr regelmäßige Abnahme der Giftigkeit der Salze mit der Abnahme der Temperatur von 36 bis 0°: bei 0° ist die Aktivität der Salze die geringste, bei 36° die größte.

Ein abweichendes Verhalten bei denselben Temperaturbedingungen zeigen die auf das Plasma energischer wirkenden Salze, wie die Rhodanide und Jodide.

Tabelle III. Versuchspflanze: Rotkohl.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	Temperatur in °C				
	35—36	23—24	12—13	5—6	0
		KCNS 0,5 Mol.			
15 Min.	95,0	100,0	100,0	87,5	100,0
20 „	85,0	97,5	100,0	100,0	—
25 „	95,0	90,0	100,0	100,0	80,0
30 „	75,0	95,0	100,0	100,0	—
40 „	30,0	92,5	95,0	100,0	70,0
1 Std.	7,5	97,5	97,5	70,0	65,0
1 Std. 30 Min.	5,0	97,5	97,5	67,5	32,5
2 Stdn.	2,5	97,5	97,5	65,0	35,0
2 Stdn. 30 Min.	0	97,5	100,0	50,0	25,0
2 „ 50 „	—	92,5	85,0	55,0	27,5
3 „ 10 „	—	95,0	87,5	40,0	15,0

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Wir sehen aus der Tabelle III, daß nicht nur die bei den Versuchen angewandte hohe Temperatur (35 bis 36°) einen schädlichen Einfluß auf die Zellen hat, sondern auch die niedrigere (5 bis 6 und 0°) ziemlich ungünstig wirkt.

Bei 0° sind am Ende des Versuchs nur noch 15 Proz. der Zellen am Leben. Am günstigsten sind hier die mittleren Temperaturen 23 bis 24° und 12 bis 13°, bei welchen nach dem Abschluß des Versuchs etwa 8 bis 15 Proz. der Zellen in den Schnitten abgestorben waren.

Noch besser tritt die Eigentümlichkeit des eben geschilderten Temperatureinflusses in Na-Rhodanid- und K-Jodidlösung hervor.

Tabelle IV. Versuchspflanze: Rhoeo discolor.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	Temperatur in °C					
	35—36	22—23	14—15	9—10	4—5	0
		NaCNS 0,25 Mol.				
10 Min.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
30 „	95,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 Std.	91,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 Stdn.	39,4	100,0	100,0	100,0	100,0	91,6
3 „	35,0	100,0	100,0	100,0	100,0	86,0
4 „	23,9	92,7	100,0	100,0	100,0	86,0
5 „	27,3	—	100,0	100,0	100,0	88,3
6 „	6,3	85,1	100,0	100,0	100,0	83,1
7 „	0	62,7	100,0	100,0	100,0	77,3
10 „	—	27,1	95,0	100,0	100,0	31,9
12 „	—	16,7	—	—	—	28,8
18 „	—	0	51,5	84,8	—	0
23 „	—	—	24,9	91,2	35,1	—
24 „	—	—	14,5	76,6	25,8	—
25 „	—	—	6,8	70,6	20,8	—

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in den Lösungen	Temperatur in °C					
	35—36	22—23	14—15	9—10	4—5	0
	KJ 0,8 Mol. Versuchspflanze: Rotkraut.					
5 Min.	90,0	95,0	100,0	100,0	100,0	100,0
15 „	42,5	97,5	100,0	100,0	100,0	90,0
20 „	25,0	85,0	100,0	100,0	100,0	57,5
30 „	15,0	82,5	100,0	100,0	100,0	40,0
45 „	5,0	60,0	100,0	100,0	100,0	22,5
1 Std.	2,5	70,0	80,0	100,0	100,0	17,5
1 Std. 20 Min.	0	57,5	77,5	100,0	52,5	5,0
1 „ 40 „	—	27,5	80,0	97,5	50,0	2,5
2 Stdn.	—	17,5	67,5	77,5	55,0	0
2 Stdn. 30 Min.	—	0	52,5	67,5	37,5	—
3 Stdn.	—	—	52,5	67,5	25,0	—
4 Stdn. 30 Min.	—	—	30,0	55,0	10,0	—
6 Stdn.	—	—	27,5	57,5	0	—

Jede Zahl bedeutet das Durchschnittsprozent der lebenden Zellen in 10 Schnitten.

Die verhältnismäßig günstigste Temperatur für die Zellen (Tabelle IV) ist hier 9 bis 10°. In den Salzlösungen bleiben bei diesen Bedingungen nach 25 Stunden 70 bzw. 55 bis 57 Proz. der Zellen am Leben. Ein Sinken der Temperatur von 10 bis 0°, sowie das Steigen von 10 bis 23° fördert fast in gleicher Weise die koagulierende Wirkung der Salze. In K-Jodidlösung fördert die niedrige Temperatur (von 10 bis 0°) die Giftigkeit der Salze etwas mehr als die höhere (von 10 bis 23°). In Na-Rhodanidlösung steigt aber diese Wirkung in beiden Richtungen von dem günstigen Mittelpunkt (10°) ziemlich gleichmäßig. Die Kurven der Abb. 2 zeigen dieses deutlich.

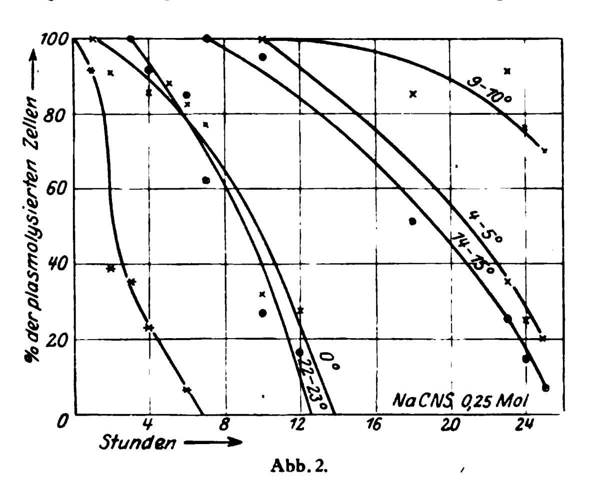


Abb. 2.

Untersuchen wir nun die Ursachen der oben angeführten Versuchsergebnisse.

Es liegt der Gedanke nahe, daß wir hier in erster Linie mit einer Permeabilitätserscheinung zu tun haben. Bekanntlich ist die Durchlässigkeit des Plasmas bei niedrigeren Temperaturen viel kleiner als bei

den höheren. Dieses ist insbesondere für den Durchtritt von Wasser durch das Plasma gefunden worden. So zeigen die älteren plasmolytischen Versuche von *Rysselberghe*, daß die Ex- und Endosmose von Wasser bei 20° siebenmal so schnell ist als bei 0°. *Delf*[1]) fand mit der Gewebespannungsmethode, daß bei den Zwiebelblättern die Wasserbewegung durch das Plasma durch die Temperatursteigerung von 5 bis 40° etwa 14mal beschleunigt wurde, wobei diese Permeabilitätsvergrößerung bei höherer Temperatur relativ größer ist als bei der niedrigeren (5 bis 15° 1,4mal, 30 bis 40° dreimal).

Über den Einfluß der Temperatur auf den Durchtritt der Salze durch das Plasma haben wir sehr wenige Beobachtungen. So zeigte *Collander*[2]), daß die Farbstoffspeicherung bei 4 bis 10° bedeutend langsamer vor sich geht als bei 25°. Derselbe Autor fand ferner[3]) mit der Methode der elektrischen Leitfähigkeit, daß die Exosmose der Zellsaftelektrolyte mit der Temperatursteigerung rasch zunimmt. „Einer Temperaturerhöhung um 4° entspricht nämlich zwischen 28 und 40° eine 1,8malige Vergrößerung der Permeabilität und von 40 bis 44° wurde sogar ein Zuwachs im Verhältnis 1 : 2,2 gefunden". Aus den beschriebenen Tatsachen geht hervor, daß mit der Temperatursenkung die von der Zelle aufgenommenen Mengen des Salzes immer kleiner und kleiner werden.

Wir haben in früheren Untersuchungen[4]) gezeigt, daß diejenigen Neutralsalze dem Plasma gegenüber die giftigsten sind, die am schnellsten in die Zelle permeieren. Von diesem Standpunkte aus wäre das abnehmende Koagulationsvermögen der Salze mit der Senkung der Temperatur in den Fällen leicht verständlich, in welchen die tödliche Wirkung bei niederen Temperaturen sich regelmäßig vermindert, wie z. B. bei KNO_3, KCl und K_2SO_4.

Um sich über die Eindringungsverhältnisse der Salze bei verschiedenen Temperaturen unmittelbar zu überzeugen, habe ich Permeabilitätsversuche nach *Fitting*scher Methode mit NaCl, KNO_3 und KCNS angestellt. Die Temperaturen wurden in oben beschriebener Weise erhalten.

Wir sehen aus der Tabelle V, daß NaCl bei 0° nicht in die Zelle eindringt, oder richtiger, die eingedrungenen Salzmengen sind so unbeträchtlich, daß sie mit dieser Methode nicht wahrnehmbar sind.

Plasmolytisches Gleichgewicht wird bei 0° erst nach etwa 3 bis 5 Stunden hergestellt, ja es kommt sogar vor, daß bei den Schnitten, wo im Laufe von 12 Stunden keine plasmolysierten Zellen zu bemerken waren, beim Durchsehen nach 24 Stunden einige Zellen die Plasmolyse zeigen.

Dieses deutet auf die langsame Exosmose von Wasser. Nach 24 Stunden ist nirgends bei 0° ein Rückgang der Plasmolyse zu bemerken.

Die Kontrolluntersuchungen zeigten, daß fast alle Zellen in den Schnitten am Leben waren. Nur einige allerdings sehr wenige Zellen waren hier und da abgestorben.

Bei 18 bis 19° wird die endgültige Größe der Plasmolyse nach 1 Stunde erreicht.

---

[1]) *M. Delf*, Ann. of Botany. **30.**

[2]) *R. Collander*, Jahrb. f. wiss. Bot. **60**, 354, 1921.

[3]) Derselbe, „Untersuchungen über den Thermotropismus der Pflanzen". Helsingfors 1919 (Dissertation).

[4]) l. c.

Tabelle V. NaCl in Mol. Versuchspflanze: Rhoeo discolor.

Temperatur 0° C.

Nach	0,14	0,1425	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575	0,16	0,1625	0,165	0,1675	0,17	0,1725	0,175	0,175	0,18
20 Min.	0	0	gv	gv	0	gv	0	gv	v	0	gv	gv	v	v	gv	v	v
2 Stdn.	0	0	v	v	v	1/2	1/4	v	< 1/4	1/4	1/4	v	1/2	1/2	> 1/2	1/2	3/4
5 „	0	0	v	v	v	> 1/2	1/4	v	1/3	1/4	1/2	1/4	> 1/2	> 1/2	3/4	3/4	pl
7 „	0	0	v	v	v	1/2	< 1/4	v	1/3	1/4	1/2	1/4	1/2	1/2	3/4	3/4	pl
12 „	0	0	v	v	v	1/2	< 1/4	v	1/3	1/4	1/2	1/4	1/2	1/2	3/4	3/4	pl
24 „	v	v	v	v	v	1/2	< 1/4	v	1/3	1/4	1/2	1/4	1/2	1/2	3/4	3/4	pl

Temperatur 18—19° C.

Nach	0,125	0,1275	0,13	0,1325	0,135	0,1375	0,14	0,1425	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575	0,16
20 Min.	0	v	1/4	1/2	> 1/2	∞	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
1 Std.	0	v	1/2	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
3 Stdn.	0	v	1/2	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
5 „	0	0	0	3/4	∞	∞	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
7 „	0	0	0	1/2	1/2—3/4	3/4	∞	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
24 „	0	0	0	0	0	0	1/4	0	1/2	1/2	3/4	1/2	1/2	3/4	3/4

Temperatur 30—33° C.

Nach	0,12	0,1225	0,125	0,1275	0,13	0,1325	0,135	0,1375	0,14	0,1425	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575
20 Min.	0	gv	1/3	< 1/2	3/4	∞	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
1 Std.	0	gv	1/3	1/2	3/4	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
3 Stdn.	0	0	0	gv	< 1/4	< 3/4	3/4	∞	∞	pl	∞	pl	pl	pl	pl	pl
5 „	0	0	0	0	0	1/2	1/2	3/4	∞	∞	1/2—3/4	pl	∞	pl	3/4	pl
7 „	0	0	0	0	0	0	1/4	1/4	> 1/2	> 1/2	1/2	∞	3/4	∞	< 3/4	∞
24 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = keine Plasmolyse, gv, v, 1/4, 1/2, 3/4 = ganz vereinzelte, vereinzelte, Drittel, Hälfte usw. der Zellen plasmolysiert, ∞ fast alle Zellen, pl = alle Zellen plasmolysiert.

Der Rückgang der Plasmolyse beginnt nach 3 Stunden. Von dieser Zeit an dringt das Salz in alle Zellen ein. Eine Kontrolle nach 24 Stunden zeigte, daß nur sehr wenige Zellen in den Schnitten abgestorben waren.

Bei 30 bis 33° wird das plasmolytische Gleichgewicht nach etwa 20 Minuten hergestellt. Die Deplasmolyse beginnt nach 1 Stunde. Im allgemeinen ist das Eindringen der Salze viel größer als bei 18 bis 19°.

NaCl ist ein verhältnismäßig unschädliches Salz. Viel giftiger ist schon das KNO_3.

Sehen wir nun, wie die Permeabilität für das letztere Salz durch verschiedene Temperaturen beeinflußt wird.

Aus der Tabelle VI ist zu ersehen, daß bei 0 bis ½° die endgültige Größe der Plasmolyse im Zeitraume von 9 bis 24 Stunden nach dem Überbringen der Schnitte in die Lösungen erreicht wird. Ein Rückgang der Plasmolyse (= Eindringen des Salzes) ist nicht zu konstatieren.

Die Kontrolluntersuchung zeigte, daß nach 24 Stunden viele Zellen in den Schnitten abgestorben waren: in einigen ¼ bis ⅓, in den anderen sogar ½ bis ¾ aller Zellen.

Bei 6 bis 7° wird etwa nach 3 Stunden das plasmolytische Gleichgewicht hergestellt, und von dieser Zeit an beginnt das nicht beträchtliche Eindringen des Salzes. Nach 24 Stunden ist die Plasmolyse nur in zwei Fällen (wo vereinzelte Zellen plasmolysiert waren) vollständig zurückgegangen.

Die Kontrolle zeigte, daß nur wenige Zellen abgestorben waren, in einigen Fällen bis ¼ aller Zellen. Bei 18 bis 19° verhalten sich die Zellen genau so, wie das *Fitting*[1]) in seinen ausgedehnten Untersuchungen beschrieben hat. Nach 20 Minuten[2]) beginnt die Plasmolyse zurückzugehen und die völlige Deplasmolyse wird nach 24 Stunden erreicht. Die Kontrolluntersuchung zeigte, daß in den Schnitten nur einzelne Zellen abgestorben waren.

Bei 30 bis 33° geht die Plasmolyse schon im Zeitraum von 6 bis 9 Stunden vollständig zurück; dabei zeigte die Kontrolle, daß in den Schnitten wenige, bis ⅓ der Zellen abgestorben waren.

Kaliumrhodanid (Tabelle VII) gehört zu den sehr schnell eindringenden (giftigen!) Salzen, und infolgedessen ist der Einfluß der Temperatur etwas anders als bei den oben beschriebenen Salzen. Bei 0° ist die Plasmolyse bereits im Zeitraum von 20 Minuten bis 1 Stunde stabil geworden, und nach 3 Stunden ist sie schon teilweise zurückgegangen. Nach 24 Stunden sind alle Zellen deplasmolysiert. Die Kontrolle zeigte, daß nach 7 Stunden in den Schnitten die meisten Zellen noch lebten und nur wenige abgestorben waren. Dagegen waren nach 24 Stunden noch ein kleiner Teil (⅕ bis ⅓) der Zellen lebend und die meisten tot.

Bei 6 bis 7° ist das Eindringen des Salzes größer als bei 0°. Der Rückgang der Plasmolyse beginnt nach der ersten Stunde. Nach 7 Stunden sind bereits beträchtliche Mengen des Salzes in die Zellen permeiert, wobei in den Schnitten hier und da einige Zellen abgestorben sind. Nach 24 Stunden sind alle Zellen deplasmolysiert. Die Zahl der toten Zellen hat stark zugenommen und beträgt in verschiedenen Schnitten ½ bis ¾ aller Zellen.

---

[1]) *Fitting*, Jahrb. f. wiss. Bot. 56, 1, 1915.

[2]) Bei den vorliegenden Versuchen wurde aus praktischen Gründen die erste Untersuchung nach 20 Minuten statt der von *Fitting* empfohlenen 15 Minuten nach Übertragung der Schnitte in Lösungen vorgenommen.

Tabelle VI. KNO_3 in Mol. Versuchspflanze Rhoeo discolor.

Temperatur 0—1/2°C.

Nach	0,1275	0,13	0,1325	0,135	0,1375	0,14	0,1425	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575	0,16	0,1625	0,165	0,1675	0,17	0,1725	0,175	0,1775
20 Min.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	gv	< 1/4	0	1/4	gv	v	v
1 Std.	0	0	0	gv	gv	v	0	0	v	gv	v	v	gv	v	1/4	1/2	v	1/2	1/2	< 1/2	1/2
3 Stdn.	0	0	0	gv	gv	v	v	gv	< 1/4	< 1/4	1/2	v	1/4	< 1/4	1/2	∞	1/2	∞	3/4	3/4	3/4
6 "	0	0	gv	gv	gv	v	v	v	1/4	< 1/4	1/2	v	1/3	1/2	1/2—3/4	∞	1/2	∞	3/4	3/4	3/4
9 "	0	0	gv	gv	gv	v	v	v	1/4	< 1/4	1/2	v	1/3	1/2	3/4	∞	1/2	∞	3/4	3/4	3/4
24 "	0	1/2	1/4	1/2	3/4	1/2	1/2—3/4	v	3/4	3/4	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl

Temperatur 6—7°C.

Nach	0,1325	0,135	0,1375	0,14	0,1425	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575	0,16	0,1625	0,165	0,1675	0,17	0,1725	0,175
20 Min.	0	0	0	0	0	gv	v	gv	gv	∞	< 1/4	gv	gv	1/4	1/3	< 1/4	1/4	< 1/4
1 Std.	gv	v	v	v	1/4	3/4	3/4	3/4	3/4	v	∞	∞	∞	pl	pl	pl	pl	pl
3 Stdn.	0	1/4	1/4	1/4	3/4	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
6 "	0	0	v	v	1/2	3/4	3/4	3/4	∞	pl	pl	3/4	pl	pl	pl	pl	pl	pl
24 "	0	0	v	v	v	3/4	3/4	3/4	3/4	pl	pl	3/4	pl	pl	pl	pl	pl	pl

Temperatur 18—19°C.

Nach	0,1225	0,125	0,1275	0,13	0,1325	0,135	0,1375	0,14	0,1425	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575	0,16	0,1625
20 Min.	0	1/3	1/2—3/4	v	1/4	1/3	3/4	pl	pl	∞	pl	3/4	pl	pl	pl	pl	> pl
1 Std.	0	v	1/2	gv	v	1/4	1/2	∞	pl	3/4	pl	1/2	pl	pl	pl	pl	∞
3 Stdn.	0	0	1/4	0	0	gv	1/4	∞—3/4	∞	1/2	pl	1/3	pl	∞	pl	pl	1/2
6 "	0	0	0	0	0	0	0	> 1/2	3/4	1/4	∞—pl	v	∞	3/4	pl	∞—pl	v
24 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	v	0	0

Temperatur 30—33°C.

Nach	0,1225	0,125	0,1275	0,13	0,1325	0,135	0,1375	0,14	0,1425	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575	0,16	0,1625
20 Min.	0	v	gv	< 1/4	0	1/3	pl	∞	3/4	pl	pl	3/4	pl	pl	∞	pl	pl
1 Std.	0	gv	0	0	0	1/4	pl	1/2	< 3/4	pl	pl	1/2	∞—pl	pl	3/4	pl	3/4
3 Stdn.	0	0	0	0	0	0	1/2	0	v	3/4	∞	0	∞	v	0	∞	[illegible]
6 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Nach	0,1475	0,15	0,1528	0,155	0,1575	0,16	0,1625	0,165	0,1675	0,17	0,1725	0,175	0,1775	0,18	0,1825	0,185	0,1875
20 Min.	0	0	0	gv	gv	gv	gv	v	< 1/4	v	1/4	3/4	3/4	< 1/2	1/2—3/4	∞	3/4
1 Std.	0	v	v	v	1/4	< 1/4	1/3	< 1/4	1/2	1/3	< 3/4	∞	3/4	∞	3/4	pl	pl
3 Stdn.	0	0	0	0	0	gv	gv	gv	1/3	< 1/4	< 3/4	∞	3/4	∞	∞	pl	pl
5 „	0	0	0	0	0	gv	0	0	v	v	< 3/4	∞	3/4	∞	∞	pl	pl
7 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/4	v	v	3/4	∞	pl

Temperatur 6—7°C.

Nach	0,1375	0,14	0,1425	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575	0,16	0,1625	0,165	0,1675	0,17	0,1725	0,175	0,1775	0,18	0,1825	0,185
20 Min.	0	v	v	< 1/4	< 1/4	1/4	1/3	v	1/4	1/3	1/3	1/4	1/2	< 1/2	3/4	1/2	1/2—3/4	pl	pl	pl
1 Std.	0	1/4	> 1/4	3/4	3/4	∞	pl	pl	> 1/2	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
3 Stdn.	0	0	gv	1/2	1/2	1/2	∞	∞	1/2	∞	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
5 „	0	0	0	< 1/4	1/3	1/2	3/4	3/4	1/3	3/4	∞	∞	∞	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl
7 „	0	0	0	0	gv	gv	gv	0	v	v	1/2	1/2	3/4	1/2	3/4	∞	3/4	∞	pl	pl
24 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Temperatur 18—19°C.

Nach	0,14	0,1425	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575	0,16	0,1625	0,165	0,1675	0,17	0,1725	0,175	0,1775	0,18	0,1825	0,185
20 Min.	0	v	v	1/2	1/2—3/4	< 3/4	1/2	3/4	∞	∞	pl	3/4	∞	∞—pl	∞—pl	pl	pl	pl	pl
1 Std.	0	0	gv	v	1/2—3/4	1/3	1/4	1/2	3/4	3/4	pl	1/2	∞	∞—pl	∞—pl	pl	pl	∞	pl
3 Stdn.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/4	1/2	1/3	1/4	1/2
5 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	v	1/4	0	1/3
7 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Temperatur 30—33°C.

Nach	0,145	0,1475	0,15	0,1525	0,155	0,1575	0,16	0,1625	0,165	0,1675	0,17	0,1725	0,175	0,1775
20 Min.	0	1/4	1/3	1/2—3/4	∞	∞	pl	pl	pl	pl	pl	pl	∞	pl
1 Std.	0	v	1/4	1/3	∞	∞	pl	∞	∞	pl	pl	pl	∞	pl
3 Stdn.	0	0	0	0	0	v	> 1/2	0	0	3/4	1/2	1/8	3/4	1/2
5 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bei 18 bis 19° hat sich die Permeabilität für KCNS stark vergröße im Vergleich zu der bei 6 bis 7°.

Schon nach 3 Stunden ist der größte Teil der Zellen deplasmolysier nach 7 Stunden ist die Plasmolyse bei allen Schnitten zurückgegange Die Kontrolle zeigt, daß nur wenige Zellen abgestorben waren.

Bei 30 bis 33° ist das Eindringen des Kaliumrhodanids merklich größ als bei 18 bis 19°. Nach 5 Stunden ist die Plasmolyse überall zurückgegange dabei ist die Zahl der toten Zellen größer als bei 18 bis 19°, in einige Schnitten waren sogar ½ bis ¾ aller Zellen tot.

Aus den oben angeführten Versuchen (Tabelle V bis VII) sieht ma daß die Permeabilität für Salze mit der Temperatursteigerung bedeuten größer wird, bei verschiedenen Salzen aber ganz verschieden, und zwa je besser ein Salz bei gewöhnlichen Bedingungen (bei Zimmertemperatu eindringt, desto mehr wird sein Permeieren durch die Temperatursteigerun gefördert.

Sogar die niedrige Temperatur hat auf solche Salze weniger Einfluß so z. B. permeiert KCNS bei 0° beinahe ebensogut wie KNO_3 bei 18°

Dagegen bei einem mittelmäßig permeierenden Salz, wie etwa bei NaCl wird das Eindringungsvermögen bei 0° außerordentlich stark herabgesetzt im Laufe der ersten 24 Stunden werden fast keine wahrnehmbaren Menge aufgenommen.

Nach der Analogie würde das auch für andere mehr oder wenige schwer permeierende Salze, wie z. B. für Sulfate, Tartrate, Citrate, Acetat (insbesondere der Na- und Li-Salze) Geltung haben. Die Temperatur-erhöhung fördert beim NaCl das Eindringungsvermögen ziemlich mäßig So dringt ungefähr nach 7 Stunden bei 30 bis 33° ebensoviel NaCl ein, wie bei 6 bis 7° KCNS.

Im allgemeinen treten die Unterschiede in der Permeabilität für Salze bei verschiedenen Temperaturen besser hervor und mit recht verschiedenen Abstufungen.

Die angeführten Permeabilitätsversuche zeigen deutlich, daß die verschiedene Giftwirkung der Salze bei verschiedenen Temperaturen in erster Linie auf die Permeabilitätsverhältnisse zurückzuführen ist. Insbesondere betrifft dieses Salze, die mit mäßiger Geschwindigkeit eindringen und daher auch weniger giftig sind, wie z. B. die Glieder der zweiten Hälfte der lyotropen Reihe — Chloride bis Sulfate der Kalium-, Natrium- und Lithiumsalze. Freilich ist hier auch das Objekt maßgebend: bei widerstandsfähigen Pflanzen, wie etwa dem Rotkohl, tritt der Parallelismus zwischen der Permeabilitätsgröße und Giftwirkung besser hervor, als bei zarteren Objekten, wie z. B. Rhoeo discolor.

Bei allen genannten Salzen steigt mit der Temperaturerhöhung die koagulierende Wirkung in bezug auf das Plasma sehr regelmäßig, bzw. sinkt mit der Senkung der Temperatur bis 0°, wie dieses uns die Tabellen I und II zeigen (erster Typus). Bei diesem Typus der Salzwirkung besteht ein direkter Zusammenhang zwischen den eingedrungenen Salzmengen und nachheriger tödlicher Wirkung auf das Plasma.

Der schädliche Einfluß der niedrigen Temperatur (0 bis 6°) kommt beim ersten Typus der Salzwirkung nicht zum Vorschein, infolge der relativ schwächeren Giftigkeit der eingedrungenen kleinen Salzmengen. Die Summe beider schädlicher Wirkungen: der niedrigen Temperatur und des Salzes ist noch nicht für die Zelle tödlich.

Ganz anders sind die Verhältnisse bei den Salzen, deren Anionen am Anfang der lyotropen Reihenfolge stehen, wie die Rhodanide, Jodide und Bromide (zweiter Typus).

Hier permeieren auch bei niedrigen Temperaturen beträchtliche Salzmengen in die Zelle.

Durch die niedrige Temperatur, ungefähr von 6° an, wird der schädliche Einfluß des Salzes nach aller Wahrscheinlichkeit gesteigert und um so mehr, je mehr sich die Temperatur 0° nähert. Infolgedessen nimmt die Giftwirkung der Salze beim zweiten Typus von einem Mittelpunkt (bei unseren Versuchsbedingungen 9 bis 13°), bei dem das Salz relativ am unschädlichsten ist, nach oben und nach unten zu: nach oben, mit der Temperatursteigerung, infolge der raschen Permeabilitätserhöhung, denn die bei den Versuchen angewandte höchste Temperatur 36° ist bei der Versuchsdauer (5 bis 6 Stunden) nicht gefährlich für[1]) das Leben des Plasmas; nach unten infolge der Summierung der schädlichen Wirkungen des Salzes und der niedrigen Temperatur.

Die Wirkung der Salze setzt sich additiv aus den Ionenwirkungen zusammen, und deswegen haben auch die Kationen hier eine nicht mindere Bedeutung als die Anionen.

Zusammenfassung.

Es wurde die Koagulationswirkung der Alkalisalze auf das Pflanzenplasma bei verschiedenen Temperaturen von 0° bis 36° untersucht.

Es zeigte sich, daß alle untersuchten Salze nach ihrer Wirkung bei verschiedenen Temperaturen in zwei Gruppen geteilt werden können.

Bei der ersten Gruppe — hierher gehören mittelmäßig bzw. schwer eindringende Salze, wie die Chloride, Acetate, Sulfate, Citrate, Tartrate bzw. Nitrate der Kalium- und Natriumsalze — steigt die tödliche Wirkung ganz regelmäßig mit der Temperatursteigerung, wobei bei 0° das Salz innerhalb der 24 Stunden beinahe unwirksam ist, bei 36° dagegen die maximale Koagulationskraft hat.

Diese Wirkung erklärt sich durch eine starke Permeabilitätserhöhung bei der Temperatursteigerung.

Bei der zweiten Gruppe der Salze (Rhodanide, Jodide, Bromide bzw. Nitrate) sind zwei Wirkungsmaxima zu beobachten: das eine liegt, wie bei der ersten Gruppe, bei der höchsten (36°), das zweite bei der niedrigsten Versuchstemperatur (0°). In den mittleren in Be-

---

[1]) Wenn aber die angewandte hohe Temperatur sogar einen schädlichen Einfluß haben würde, so würde es viel geringer sein als der der niedrigen Temperatur und erst über 30° zur Geltung kommen; die tödliche Wirkung der Salze wächst aber in einigen Fällen von 10 bis 23° fast ebenso stark, wie 23 bis 35°.

Dieses zeigt, daß die angewandte hohe Temperatur als solche keinen wahrnehmbaren Einfluß hat.

Allerdings die Schnitte von Rhoeo discolor im Wasser bei 35° nach 8 Stunden und bei 0° nach 24 Stunden hatten keine toten Zellen.

tracht kommenden Temperaturen (etwa 9 bis 13⁰) ist die Koagulationsenergie der Salze am schwächsten.

Alle Salze der zweiten Gruppe permeieren im allgemeinen schnell in das Plasma, und durch die niedrige Temperatur wird ihre Wirkung vermutlich stark erhöht.

In einigen Fällen entscheidet auch das Objekt, ob ein Salz nach der Wirkung zur ersten oder zweiten Gruppe gehört. Dieses betrifft besonders diejenigen Salze, deren Anionen in der Mitte der lyotropen Reihenfolge stehen, wie z. B. die Nitrate und Chloride.

In diesen Salzlösungen kann man bei zarteren Objekten zwei Wirkungsmaxima beobachten, bei den widerstandsfähigeren Objekten aber nur ein Maximum. So z. B. gehört KNO_3 (s. Tabelle I), wenn zum Versuch Rotkohlschnitte genommen werden, zur ersten Gruppe, wenn aber die Schnitte von Rhoeo discolor stammen (s. Tabelle VI), zur zweiten Gruppe.

Über die Viskosität von Blutkörperchensuspensionen. II.

Von

L. Berczeller und **H. Wastl.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 27. Oktober 1925.)

Anläßlich von Versuchen über die Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen im strömenden Blute[1]) ergab sich die Notwendigkeit, die relative Viskosität von dichten Blutkörperchensuspensionen (Blutkörperchenbreie) zu bestimmen, welche nur wenige Prozent Plasma enthielten[2]). Es zeigte sich nämlich, daß die Fließgeschwindigkeit der Blutsäule nach Beginn der Senkung (die infolge der langsamen Bewegung der Blutsäule außerordentlich beschleunigt ist) um so mehr abnahm, je vollständiger sich Blutkörperchen und Plasma mit der Zeit voneinander trennten. Modellversuche sind immer nur mit großer Vorsicht mit den Verhältnissen im Tierkörper selbst in Analogie zu setzen. Von einem von uns[3]) ist die Annahme ausgeführt worden, daß in der Kreislaufperipherie eine sehr weitgehende Trennung der Bewegung der roten Blutkörperchen und des Plasmas vorhanden ist. Diese Trennung kommt zwischen den kleinen Arterien und Venen zustande und wird dann wieder ausgeglichen. Die größere Neigung der roten Blutkörperchen zur Agglutination (in vitro erhöhte Senkungsgeschwindigkeit) und die mikroskopisch beobachteten Störungen des Kapillarkreislaufs (körnige Strömung, Stasen, Kapillarembolien) in vielen pathologischen Fällen stehen im engsten Zusammenhang und bilden einen bedeutsamen, noch viel zu wenig beachteten Faktor im Krankheitsbild[4]).

---

[1]) *L. Berczeller* und *H. Wastl*, Klin. Wochenschr. **1924**, Nr. 5; diese Zeitschr. **158**, 100, 1924.

[2]) *Dieselben*, diese Zeitschr. **158**, 111, 1924; Pflügers Arch. **208**, 436, 1924.

[3]) *L. Berczeller*, diese Zeitschr. **149**, 592, 1924.

[4]) *K. v. Neergard*, Klin. Wochenschr., Jahrg. 4, 1925, Nr. 15, S. 689 bis 694.

Die Bewegung des Blutes wird daher in den kleinsten Arterien bereits durch die Viskosität des Plasmas einerseits und der nur wenig Plasma eingeschlossen enthaltenden Blutkörperchensuspensionen andererseits mit bestimmt. Diesbezügliche Versuche ergaben, daß die Viskosität (Fließbarkeit) von dichten Blutkörperchensuspensionen (bis 5 Proz. Plasma) sehr different ist, je nach der Blutart, der Gewinnung (Citrat-, Oxalat- oder defibriniertes Blut) und dem Gasgehalt; dabei sind Veränderungen der Viskosität an diesen Blutkörperchenbreien viel empfindlicher nachzuweisen als an den die gesamte Plasmamenge enthaltenden Blutproben.

In dieser Arbeit sind einige vergleichende Untersuchungen an Blut von Säugern und Vögeln unter Bestimmung der Blutkörperchenbreiviskosität bei verschiedenen Temperaturen angeführt.

Die relative Viskosität wurde mit *Ostwald*schen Viskosimetern oder durch Ausfließenlassen aus Pipetten bestimmt, die in entsprechend temperierten Wasserbädern untergebracht waren. Das Blut befand sich vor jeder Messung zum Temperaturausgleich im Wasserbade bei der betreffenden Temperatur. Verglichen sind immer nur mit dem gleichen Meßinstrument und unter gleichen Bedingungen erhaltene Werte. Alle hier angeführten Versuche sind mit derselben Pipette gewonnen[1]). Bei den Vogelblutarten mußte immer Mischblut mehrerer Individuen desselben Geschlechts benutzt werden, die anderen Blutproben stammen von denselben Individuen. Die Blutkörperchenbreie wurden durch scharfes Zentrifugieren gewonnen und mittels Hämatokriten auf ihren Plasmagehalt geprüft. Nur Breie mit bis zu 5 Proz. Plasmagehalt wurden für den Versuch verwendet.

Sowohl die Plasma- (Serum-) wie die Blutviskositätswerte zeigen eine ziemlich große Konstanz, während die Werte für die Blutkörperchenbreie bei Vogelblut durchgehends wesentlich höher liegen als bei Säugerblut. Dies gilt sogar noch für die dreimal mit Ringerlösung gewaschenen und dann wieder scharf abzentrifugierten Blutkörperchenbreie. An anderer Stelle[2]) haben wir darauf hingewiesen, daß bei Säugerblut die Viskosität der Blutkörperchenbreie (mit Pipetten gemessen) regelmäßig unter dem 40fachen der Blutviskosität blieb. Nur bei Schweineblut konnten wir gelegentlich ein Überschreiten dieser Grenze beobachten. Die Messungen erstreckten sich auf Menschen-, Pferde-, Rinder-, Hammel-, Ziegen-, Kaninchen-, Hunde-, Katzen-, Meerschweinchen-, Ratten- und Schweineblut. Ferner ergibt sich aus Tabelle I, daß das Plasma die Viskosität der Blutkörperchenbreie sehr stark erhöht, denn die

---

[1]) Der Wasserwert dieser (2 ccm) Pipette war $3^1/_5''$.
[2]) *L. Berczeller* und *H. Wastl*, diese Zeitschr. **158**, 111, 1924.

Tabelle I.

Viskositätswerte bei 18°. (Mittelwerte aus mehreren Einzelbestimmungen.)

Tier	Geschlecht	Durchflußzeit in Sekunden im: A. Plasma		B. Blut		C. Brei		D. Gewaschenen Brei		Koeffizient: Blut / Plasma		Brei / Blut		Gewasch. Brei / Blut		Plasmabrei / Gewasch. Brei	
		Plasma	Serum	Oxalat	defibrin	Oxalat	defibrin.	Oxalat	defibrin.	Plasma	Serum	Oxalat	defibrin.	Oxalat	defibrin.	Oxalat	defibrin.
Gans . . .	♂	4,3	4,6	6,4	5,4	524	—	75,2	—	1,5	1,4	82	—	13,9	—	6,97	—
Gans . . .	♀	4,3	4,5	6,1	6,1	459	—	81,1	—	1,4	1,3	75	—	13,3	—	5,66	—
Huhn . . .	♂	4,1	4,3	6,1	5,7	395	244,5	109,0	104,7	1,5	1,3	64,8	42,9	17,9	20,1	3,63	2,34
Ente . . .	♂	4,3	4,3	6,9	7,0	252	312	111,9	153,3	1,6	1,6	36,5	44,5	16,2	21,9	2,24	2,03
Ente . . .	♀	4,7	4,5	6,3	6,7	324	283	98,0	115,5	1,3	1,5	53,0	42,2	15,6	17,2	3,41	2,46
Hund . . .	♂	4,3	4,5	6,4	6,5	149	112	64,4	55,3	1,5	1,4	23,3	18,8	10,6	8,5	2,31	2,20
Hund . . .	♀	4,8	4,6	7,2	7,6	151	132	—	41,4	1,5	1,6	21,0	17,4	—	5,4	—	3,19
Mensch . .	♂	4,2	4,4	8,8	9,0	99,0	118,0	70,0	—	2,1	2,0	11,2	13,1	8,0	—	1,41	—
Mensch . .	♀	4,5	4,7	7,9	7,6	40	45	—	27,5	1,8	1,7	5,0	5,9	—	3,5	—	1,71
Hammel .	—	—	4,5	—	7,6	—	45,8	—	32,8	—	1,7	—	6,0	—	4,3	—	1,3
Mittelwert Vogelblut		4,34	4,44	6,36	6,18	392,8	279,8	95,0	124,5								
Mittelwert Säugerblut		4,45	4,54	7,6	7,66	109,8	92,6	67,2	39,2								

Viskosität der mit Ringer gewaschenen Blutkörperchenbreie ist durchgehends wesentlich geringer[1]).

Dies zeigt eine direkte „Klebewirkung“ des Plasmas auf die roten Blutkörperchen. Diese „Klebewirkung“ mußten wir annehmen, um die Senkungserscheinungen erklären zu können, da man die Senkung der roten Blutkörperchen schon im Beginn derselben nicht als das Sinken einzelner, allein stehender, roter Blutkörperchen auffassen kann.

Tabelle II führt dieselben Blutproben an wie Tabelle I, gemessen bei 38°.

Die Viskosität der Blutkörperchenbreie nimmt mit zunehmender Temperatur stark ab, und zwar ist diese Abnahme ganz allgemein bedeutend größer als die Abnahme der Viskosität des Plasmas und des Blutes (bezogen auf die jeweiligen Viskositätswerte bei Zimmertemperatur). Diese Erscheinung zeigt, daß die Viskosität dieser dichten Suspensionen zum Teil als bedingt durch die Klebewirkung der zwischen den Blutkörperchen befindlichen Flüssigkeit — insbesondere Plasma — aufgefaßt werden muß. Diese Klebewirkung nimmt, bevor die Hitzegerinnungserscheinungen auftreten, mit steigender Temperatur ab. Dabei ist wieder die Viskosität der Vogelblutkörperchensuspensionen wesentlich höher als die der Säugerblutkörperchenbreie. Es scheint sogar — die zu geringe Anzahl unserer Beobachtungen erlaubt darüber noch keine sichere Aussage —, daß der Unterschied zwischen Vogelblut und Säugerblut bei ungefähr Körpertemperatur ausgeprägter ist als bei Zimmertemperatur. Dies legt nahe, wenn man die relativen Viskositätswerte von Blutkörperchenbreien für physiologische Vergleichszwecke heranziehen will — und diese Werte werden viel aufschlußreicher sein als die Viskositätswerte des Blutes —, diese bei Körpertemperatur zu bestimmen. Denn wenn auch im allgemeinen ein Parallelgehen der verschiedenen Werte bei Zimmer- oder Körpertemperatur bis zu einem gewissen Grade zu beobachten ist, so kann man doch nicht von den bei Zimmertemperatur erhaltenen Werten auf die bei 38° zu erwartenden folgern. Dabei spielt die Art der Gewinnung der roten Blutkörperchen — ob aus defibriniertem Blute oder aus Blut mit

---

[1]) Wie gering die Schichtdicke bei diesen Plasmamengen zwischen den einzelnen roten Blutkörperchen ist, zeigt folgende Rechnung: Die Oberfläche eines menschlichen roten Blutkörperchens mit 128 μ^2 angenommen, beträgt die gesamte Oberfläche der roten Blutkörperchen in 1 ccm Blutkörperchenbrei 6400 qcm. Zugemischtes Plasma in der Menge von 5 Proz. würde eine Schicht von 0,08 μ Dicke über die ausgebreitete Fläche der roten Blutkörperchen bilden; zwischen zwei roten Blutkörperchen wäre also in diesem Falle eine Plasmaschicht von 0,16 μ Dicke vorhanden, was etwa 8 Proz. der größten Dicke des menschlichen Blutkörperchens ausmacht.

Tabelle II.

Viskositätswerte bei 38°.

Tier	Geschlecht	Durchflußzeit in Sekunden im:								Koeffizient							
		A. Plasma		B. Blut		C. Blutkörperchenbrei		D. gewasch. Blutkörperchenbrei		Blut / Plasma		Breiblutkörp. / Blut		Gewasch. Brei / Blut		Plasmabrei / Gewasch. Brei	
		Plasma	Serum	Oxalat	defibrin.	Oxalat	defibrin.	Oxalat	defibrin.	Plasma	Serum	Oxalat	defibrin.	Oxalat	defibrin.	Oxalat	defibrin.
Gans . . .	♂	4,6	4,1	5,0	5,0	—	—	56,0	—	1,2	1,2	—	—	11,2	—	—	—
Gans . . .	♀	3,9	3,9	5,1	5,1	—	—	62,4	—	1,3	1,3	—	—	12,2	—	—	—
Huhn . . .	♂	4,1	3,9	5,2	4,9	—	148	87,4	70,0	1,3	1,3	—	—	16,8	14,3	—	2,11
Ente . . .	♂	3,6	3,9	5,6	5,7	180,0	222,4	67,2	111,8	1,6	1,5	32,1	39,0	12,0	19,6	2,68	1,99
Ente . . .	♀	4,0	4,0	5,5	5,6	237,4	180,0	57,4	62,8	1,4	1,4	43,2	32,0	14,4	11,2	4,14	2,86
Hund . . .	♂	4,0	4,0	5,2	5,2	84,0	94,0	46,0	38,0	1,3	1,3	16,1	18,1	8,8	7,3	1,83	2,49
Hund . . .	♀	3,9	4,1	5,6	5,6	21,2	67,0	17,6	28,2	1,4	1,4	3,8	12,0	3,1	5,0	1,26	2,37
Mensch . .	♂	4,1	3,9	6,3	6,2	76,0	87,2	41,0	—	1,5	—	12,0	14,0	1,9	2,2	1,62	—
Mensch . .	♀	—	4,5	—	6,8	—	40,0	—	19,6	—	1,5	—	5,9	—	2,9	—	2,04
Hammel .	—	—	4,0	—	6,3	—	27,5	—	18,5	—	1,6	—	4,4	—	2,9	—	1,50
Mittelwert Vögel . .		3,94	3,98	5,28	5,26	208,7	176,8	66,1	81,5								
Mittelwert Säuger . .		4,00	4,10	5,70	5,97	60,4	63,2	34,9	25,8								

Zusatz gerinnungshemmender Substanzen, ob gewaschen oder ungewaschen — eine große Rolle für ihre Fließbarkeit, wie sich aus der Durchsicht der angeführten Tabellen ergibt.

Tabelle III.
Viskositätswerte im Hundeblut (♀).

	Durchflußzeit in Sekunden				
Temperatur:	4° C	17° C	38° C	50° C	55° C
Oxalatplasma	4,8	4,6	3,9	3,8	4,0
Serum	4,6	4,5	4,1	4,0	3,9
Oxalatblut	8,8	7,3	5,6	5,3	5,4
Defibrin. Blut	9,8	7,5	5,6	5,4	6,2
Oxalatbreiblutkörperchen	130	39,2	21,1	20,5	130,6
Defibrin. Breiblutkörperchen	238	132	67	46	hitzegeronnen
Oxalatbrei (dreimal gewaschen mit Säugerringer)	40	30,2	17,3	16,2	hitzegeronnen
Defibrin. Blut (dreimal gewaschen mit Säugerringer)	67,2	41,4	28,2	22,5	hitzegeronnen

Dieses Beispiel zeigt, daß die Hitzegerinnung des Blutkörperchen-inhalts keinen direkten Einfluß auf die Viskosität des Blutes ausübt. Bei 55° tritt im Blutkörperchenbrei (sowohl gewaschen wie auch ungewaschen) bereits Hitzegerinnung ein (bzw. im Oxalatblutkörperchen-brei zeigt der emporschnellende Viskositätswert die unmittelbar bevorstehende Gerinnung an), während die Viskositätswerte des Blutes gegenüber 50° nicht erhöht, sondern sogar leicht erniedrigt sind. Erst bei 60° beginnt die Blutviskosität anzusteigen. Sowohl Blut- wie Blutkörperchenbreiviskosität durchlaufen bei zunehmender Temperatur ein Minimum, aber die Veränderungen sind viel steiler und leichter nachweisbar bei den letzteren.

Tabelle IV.
Entenblut.

	Durchflußzeit in Sekunden									
	♂					♀				
Temperatur:	17° C	38° C	50° C	55° C	60° C	17° C	38° C	50° C	55° C	60° C
Oxalatplasma	4,4	3,6	—	—	—	4,5	4,0	—	—	—
Serum	4,3	3,9	—	—	—	4,3	4,0	—	—	—
Oxalatblut	6,9	5,6	5,5	6,4	7,8	6,3	5,4	5,0	5,5	6,4
Defibrin. Blut	7,1	5,7	5,6	5,8	6,1	6,7	5,5	5,3	5,5	5,9
Oxalatbrei	252,0	180,0	120,4	183,5	hitzegeronnen	334,0	237,0	131,0	hitzegeronnen	—
Defibrin. Blut	312,0	222,0	—	—	hitzegeronnen	283,0	280,0	179,2	hitzegeronnen	—
Oxalbrei (gewaschen)	111,9	67,2	39,2	47,0	111,6	98,0	57,4	37,8	49,8	141,6
Defibrin. Brei (gewaschen)	153,3	111,8	—	—	hitzegeronnen	115,5	62,8	42,2	74,0	379,2

Ähnlich verhält sich auch Vogelblut. Die Veränderung der Viskosität des Blutes folgt auch hier nur in unverhältnismäßig geringerem

Grade den großen Veränderungen des Blutkörperchenbreies. Wir haben schon bei Versuchen über die Senkung der roten Blutkörperchen darauf hingewiesen, daß das Plasma, welches zwischen den roten Blutkörperchen förmlich in Kapillarspalten eingeschlossen ist, ganz andere physikalische Eigenschaften besitzt als das Plasma, das aus diesen Spalten herausgeschleudert ist[1]). Je enger diese Kapillarspalten sind, je dichter also die Blutkörperchensuspension, um so mehr treten diese Unterschiede zutage.

Tabelle V.

		Durchflußzeit in Sekunden							
		Plasmabrei v. rot. Blutkörperchen		Gewaschener Brei		Δ4°—18°		Δ Proz. von 18° Wert	
		18° C	4° C	18° C	4° C	Plasmabrei	Gewasch. Brei	Plasmabrei	Gewasch. Brei
Hund ♀	Oxalatblut .	—	128,4	30,0	49	—	19	—	63,3
	Defibrin. Blut	132,0	238,0	41,5	67,2	106	25,7	80,3	62,0
Mensch ♂	Oxalatblut .	99,0	182,0	70,0	96,0	83	26	83,8	37,1
	Defibrin. Blut	118	221	—	—	103	—	87,3	—
Mensch ♀	Defibrin. Blut	45	110	27,5	43,3	55	15,8	122,2	57,5
Hammel	Defibriniert .	45,8	76	32,8	50	30,2	17,2	65,9	52,4

Die „Klebewirkung“ des Plasmas ist bei niedriger Temperatur eine größere. So nimmt die Viskosität der plasma- (serum-) haltigen Breie um 80 bis 122 Proz. zu gegenüber den bei Zimmertemperatur erhaltenen Werten, während die Zunahme der Viskosität des gewaschenen Breies viel geringer ist (37 bis 63 Proz.).

Es werden also die Veränderungen der Viskosität der Blutkörperchenbreie sowohl bei niedrigeren als auch bei höheren Temperaturen (von Körpertemperatur aus gerechnet) zum großen Teil durch Veränderungen des zwischen den roten Blutkörperchen eingeschlossenen Plasmas bestimmt, wenn diese Plasmamenge eine äußerst geringe ist. Mit abnehmender Temperatur nimmt die Viskosität steiler zu, mit zunehmender Temperatur steiler ab (bis zum Beginn der Hitzegerinnung) als im Blute. In der Umgebung (etwas höher) der Körpertemperatur liegt ein Minimum der Viskosität, das bei den gewaschenen Breien flacher ist als bei den plasma- (serum-) haltigen. Daneben spielt auch noch das differente Verhalten der roten Blutkörperchen je nach

[1]) Selbst Wasser in sehr dünnen Schichten zeigt eine beträchtliche Festigkeit. Siehe *Klupathy*, Math. u. naturwiss. Anzeiger 28, 393 bis 433, 1910.

Blutart und Gewinnungsweise eine große Rolle, woraus sich eine große Mannigfaltigkeit der Erscheinungen ergibt.

So wie die Senkungsreaktion der roten Blutkörperchen für die Charakterisierung der verschiedenen Tierblutarten und für Diagnose und Prognose bei einer Reihe von Erkrankungen bedeutsam sein kann, so wird es möglich sein, durch die Untersuchung der damit in Zusammenhang stehenden Viskosität der Blutkörperchensuspensionen verschiedener Dichte charakteristische Differenzen aufzudecken. Dabei ist es für Vergleichszwecke vorteilhaft, die Messungen bei Körpertemperatur anzustellen.

Studien über B-Avitaminose. I.

Von

Leon A. Tscherkes.

(Aus dem Institut der allgemeinen und experimentellen Pathologie der medizinischen Fakultät in Odessa.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1925.)

I.

Die Entwicklung der Avitaminose hängt nicht allein von einem Faktor des Vitaminhungers ab, sondern auch vom Charakter jener Diät, welche das Versuchstier erhält. Während die Einführung verschiedener anorganischer Elemente der Nahrung oder ihre Ausschaltung auf die Entwicklung der Avitaminose offenbar nicht einwirkt [*Grijns* (1), *Hirabayashi* (2), *Abderhalden* und *Ewald* (3), *Suski* (4), *Tscherkes* (5)], übt dagegen die Modifikation der organischen Komponenten der Nahrung einen wesentlichen Einfluß auf den Charakter des avitaminösen Prozesses aus. Die Avitaminose (oder genauer gesagt Hypovitaminose) kann sich darum sogar trotz des Vorhandenseins von Vitaminen entwickeln, sobald das nötige physiologische Verhältnis zwischen den Vitaminen einerseits und den organischen Bestandteilen der Nahrung andererseits gestört ist. Das Bestehen eines verschiedenen Verhältnisses des Vitaminmangels zu verschiedenen Nahrungsstoffbestandteilen der Diät veranlaßte mich, in einem Vortrage, den ich auf dem allrussischen Kongreß der Pathologen (im Jahre 1923) gehalten habe, die Überzeugung auszusprechen, daß im Falle einer Avitaminose das Prinzip des isodynamischen Ersatzes wesentlich beschränkt sein müsse (6).

In einer der früheren Mitteilungen haben wir tatsächlich bewiesen, daß bei Abwesenheit der Vitamine die verschiedenen Nahrungsrationen *von einer gleichen Kalorienzahl*, welche aber verschiedene Quantitäten verschiedener Nahrungsstoffe enthalten, nicht immer dieselbe Bedeutung für das Tier haben können. Die Resultate, welche wir bei Versuchen an Tauben erhalten haben (5), entsprechen vollständig den Ergebnissen, welche *Asada* (7) und *Desgrez* und *Bierry* (8) bei Experimenten mit Ratten erzielten. Während die Diät unserer Tiere, welche aus Fett + Kohlehydraten + anorganischen Elementen, oder aus Fett + Proteinen

+ anorganischen Elementen bestand, bei Vitaminhunger ungefähr dieselbe Lebensdauer bedingte, beschleunigte ein Nahrungsgemisch *von demselben Kalorienwert*, das aber aus Proteinen + Kohlehydraten + anorganischen Salzen bestand, sowohl den Eintritt des avitaminösen Zustandes als auch den Tod des Versuchstieres. Eine solche Begrenzung der Anwendung des Prinzips der Isodynamie wird nicht nur dadurch bedingt, daß der avitaminotische Organismus die Möglichkeit verliert, einen Nahrungsstoff durch einen anderen im Stoffwechsel zu ersetzen, sondern außerdem noch dadurch, daß der Verlauf dieses pathologischen Prozesses, wie dies bereits erwähnt wurde, ganz besonders von dem Charakter der erhaltenen Diät abhängt.

Nach den anfänglichen Bestimmungen *Funks* (9) wurde von einer Reihe von Forschern wiederholt bestätigt, daß bei Abwesenheit von Vitamin B avitaminöse Erscheinungen sich um so intensiver entwickeln, je reichhaltiger die Diät an Kohlehydraten ist. In bezug auf Eiweiß wurde von *Tscherkes* (5) festgestellt, daß dasselbe bei den *Tauben* die Entwicklung von B-avitaminösen Erscheinungen beschleunigt, während die Experimente von *Funk* und *Dubin* (10), mit *Ratten* angestellt, vitaminsparende Eigenschaften des Eiweißes zeigten. *Abderhalden* (11) ist auch der Meinung, daß die Proteine bis zu einem gewissen Grade die Entwicklung der Avitaminose hemmen. Nichtsdestoweniger ist die Meinung, daß Eiweiß von den Tieren bei Vitaminhunger schlecht vertragen werde und manchmal ihre Lage sogar bedeutend intensiver verschlimmere als die Kohlehydrate, durch die Experimente mit Ratten von *Asada* (7) und *Éderer* (12) bestätigt worden. Schließlich finden auch *Osborne* und *Mendel* (13) in den von ihnen angestellten Versuchen keinen Grund, die Eiweißstoffe zu den vitaminsparenden Substanzen zu zählen.

Die Frage über die Quantitätsverhältnisse zwischen den einzelnen Nahrungsstoffen einerseits und den Vitaminen andererseits ist nicht nur von theoretischem Interesse, sondern hatte auch eine große praktische Bedeutung Die Aufklärung dieses Zusammenhanges könnte wesentliche Korrektive in das Prinzip der Isodynamie, welches als Grundlage für die Abschätzung verschiedener Diäten (experimentelle, therapeutische, Massenernährung usw.) dient, herbeiführen Die Versuche, welche nachstehend angeführt sind, bestätigen die Ergebnisse unserer früheren Forschungen und beweisen, daß die Proteine, indem sie die Entwicklung der Avitaminose beschleunigen, in bezug auf das Vitamin B sparende Eigenschaften nicht haben.

II.

Als Versuchstiere dienten uns Tauben, und deshalb beziehen sich sämtliche Schlüsse, welche aus unseren Versuchen folgen, auf das

Vitamin B, da die Tauben weder Vitamin A und C [*Funk* (14), *Penau* und *Simonnet* (15), *Emmet* und *Peacock* (16), *Sogiura* und *Benedict* (17), *Stepp* (18)], noch Vitamin D brauchen [*Funk* und *Dubin* (19)]. Alle diese Forschungen sind von uns veranstaltet worden größtenteils dank der Mithilfe des Herrn Prof. *W. Woronin* (zurzeit Direktor des Inst. f. allg. Pathologie in Tiflis).

Als Eiweiß diente uns Casein, als Kohlehydrat Stärke, als Fett Sonnenblumenöl und anorganische Bestandteile in Form eines Salzgemisches, das *Mc Collum* und *Davis* (20) vorgeschlagen hatten. Um die Vitamine zu inaktivieren, wurden sämtliche organische Nahrungsbestandteile einer Temperatur von 130° im Laufe von 2 Stunden ausgesetzt. *Mc Collum* und *Davis* (21) haben darauf hingewiesen, daß eine solche Autoklavisierung von Casein die Moleküle dieses Proteins unvollwertig machen könne. Immerhin stellten *Funk* und *Macallum* (22) durch Experimente an Ratten fest, daß eine Zufügung von Orangensaft zum Nahrungsgemisch, bei welchem als Eiweiß das autoklavisierte Casein diente, eine solche Kost ganz vollwertig macht. Ebenso zeigen auch die Experimente von *Tscherkes* (23) an Tauben, daß Hefeautolysat den vollen Wert der Diät, in die als Eiweiß das autoklavisierte Casein hereinkam, wieder herstellte. Somit war die Minderwertigkeit des autoklavisierten Caseins in allen unseren Versuchen nicht an eine Störung des Aminosäurebestandes gebunden, sondern an eine Inaktivierung von Vitaminen.

Bei Feststellung des Kalorienbedarfs der Tauben stützten wir uns auf die Ergebnisse, welche wir bei einer unserer früheren Mitteilungen erhielten (23).

Die erste Gruppe unserer Experimente bezweckte die Aufklärung der Rolle, welche jeder von den Nahrungsstoffen bei der Entwicklung der B-Avitaminose spielt, *falls solche Nahrungsstoffe als ausschließliche Kost dienen.* Bei einem derartigen Nahrungsregime, wie es bereits durch unsere früheren Forschungen bewiesen wurde (24), entwickelte sich bei den Tauben ausschließlich B-Avitaminose. Die Ergebnisse dieser Experimente sind auf der Tabelle I angeführt.

Aus diesen Experimenten folgt, daß bei der Ernährung der Tauben ausschließlich mit *einem* der Nahrungsstoffe die B-Avitaminose am günstigsten (im Sinne einer längeren Inkubationsperiode und späteren Eintritts des Todes) in denjenigen Fällen verläuft, in denen das Tier ausschließlich mit Fett ernährt wurde (Versuche 1 und 2). Diese Tatsache ist von so großer Bedeutung besonders deshalb, weil das Eiweißminimum in der Nahrung fehlte und die Kohlehydrate, deren Mangel an sich selbst den Fettumsatz wesentlich stört (Ketogenie), ebenfalls aus der Kost ausgeschlossen wurden.

Ein derartiger Vorzug der reinen Fettdiät im Vergleich mit den isokalorischen Äquivalenten der einseitigen Kohlehydrat- und Eiweißdiät bleibt *auch bei einer Unterernährung* bestehen, wenn das Tier nur etwa 50 Proz. seines Bedarfs erhält. Und zwar: neun Tauben, zu drei Tauben auf jede Diät (Tabelle II), wurden mit *einem* der Nahrungsstoffe ernährt (die Kalorienzahl war etwa 50 Proz. des Kalorienbedarfs), und

Tabelle I.

Versuch	Zahl der Tauben	Gewicht	Quantität der Tagesnahrung	Kalorienwert der Diät	Die ersten Bewegungsstörungen erscheinen		Tod		Gewichtsverlust in Proz. des Anfangsgewichts	
					am	im Mittel am	am	im Mittel am	schwankte zwischen	war im Mittel
		g	g		Tage		Tage		Proz.	
				1. Ausschließlich Fett.						
1	5	273—295	5,5— 6,0	Notwendige Kalorienzahl	41.—57.	50,4	47.—70.	57,4	26,6—52,3	39,7
2	5	270—290	11,0—12,0	Doppelte Kalorienzahl	43.—58.	51,2	50.—62.	56,4	31 —31,9	31,4
				2. Ausschließlich Kohlehydrate.						
3	5	240—293	10,5—13,0	Notwendige Kalorienzahl	17.—18.	17,4	16.—22	20	23,9—33,7	27,2
4	5	261—300	22,0—26,0	Doppelte Kalorienzahl	15.—17.	16,4	17.—19.	17,8	28 —44,2	35,4
				3. Ausschließlich Eiweiß.						
5	7	243—306	10,5—13,0	Notwendige Kalorienzahl	19.—27.	24,4	20.—37.	24,7	18,8—37,3	24,6
6	3	263—298	22,0—26,0	Doppelte Kalorienzahl	16.—18.	17,3	16.—20.	18	17,0—21,3—27	21,7
7	3	323—385	30,5—36,0	Doppelte Kalorionzahl + 3 g	—	—	9—11—20	13,3	7,8— 8,7—26	14,1

als Resultat erwies sich, daß die Lebensdauer der mit Fett ernährten Tauben (Versuch 8) mehr als um das Doppelte länger war als die Lebensdauer derjenigen, welche mit Eiweiß (Versuch 10) oder mit Kohlehydraten (Versuch 9) ernährt wurden. Die Lebensdauer der zwei letzten Gruppen (Versuch 9 und 10) differierte wenig untereinander.

Es ist zu bemerken, daß, während *Abderhalden* (25) bei Ernährung der Tauben ausschließlich mit Fettsäuren und Glycerin keine Erscheinungen der alimentären Dystrophie beobachtete, wir in der größeren Zahl unserer Versuche bei ausschließlicher Fetternährung der Tauben ein typisches Bild von B-Avitaminose, wie dies bereits in früheren Mitteilungen (5, 24) erwähnt wurde, erhielten. Bei den ausschließlich mit Fett ernährten Tieren beobachteten wir schablonenhafte Symptome der Erschöpfung, Bewegungsstörungen, Lähmungen und Krämpfe, welche sich zum Opistotonus steigerten. Wie auch in den Fällen, wo die Tiere inaktiviertes Getreide oder Nahrungsgemische erhielten, äußerte sich auch hier als eins der *ersten Symptome Störung der motorischen Funktion des Darmkanals* (Lähmung des Kropfes usw.), was schon in einer anderen Mitteilung beschrieben wurde (26).

Die Resultate der in der Tabelle I angeführten Experimente zeigten, daß *eine Erhöhung der Quantität des Eiweißes* (Versuch 5, 6, 7) *die Entwicklung der B-Avitaminose in derselben Weise beschleunigt, wie auch die Erhöhung der Kohlehydrate* (Versuch 3 und 4), *während die Erhöhung der täglichen Rationen von Fett sich nicht in irgend einer bemerklichen Weise an der Entwicklung der Avitaminose äußert* (Versuch 1 und 2). Somit geben diese Experimente keinen Grund zur Annahme, daß die Eiweißkörper die Fähigkeit besäßen, den Bedarf des Organismus der Tauben an Vitamin B zu sparen.

Sollten die Proteine den Bedarf an Vitaminen verringern, wie es einige Forscher annehmen, so würde der Zusatz derselben zu der Fettkost die Inkubationsperiode verlängern, oder es würde jedenfalls keine Änderung in der Inkubationsperiode hervorrufen. Indessen haben die Experimente, welche wir in dieser Richtung in Gemeinschaft mit Herrn Dr. *J. Bergermann* vorgenommen haben, entgegengesetzte Resultate geliefert.

In dieser Reihe von Experimenten bekamen sämtliche Tauben im Laufe der ganzen Zeit inaktiviertes Fett in einer Menge, welche vollständig dem Kalorienbedarf der Tiere entsprach (à 5 g). Zum Fett wurde entweder inaktiviertes Casein zugesetzt oder Stärke, beide in verschiedenen Quantitäten. Außerdem bekam das Tier das erwähnte Salzgemisch. Die Resultate dieser Versuche sind in der *Tabelle III* angeführt (Versuch 11 und 12). *Trotzdem, daß den Tauben der Gruppe A das Eiweißminimum gesichert war, während die Tauben der Gruppe B das Eiweiß im Übermaß erhielten, war die Lebensdauer der Tauben*

Tabelle II.

Versuch	Zahl der Tauben	Gewicht	Quantität der Tagesnahrung	Kalorienzahl der Diät	Die ersten Bewegungsstörungen erscheinen		Tod		Gewichtsverlust in Proz. des Anfangsgewichts	
					am	im Mittel	am	im Mittel	schwankte zwischen	war im Mittel
		g	g	Proz.	Tage		Tage		Proz.	
					1. Ausschließlich Fett.					
8	3	317—244—240	2,3	50	21.—31.—52.	36,3	22.—43.—64.	43,3	38,8—34,4—40,3	37,8
					2. Ausschließlich Kohlehydrate.					
9	3	300—303	6,0	50	18.—19.—20.	19	18.—19.—20.	19	30,2—35,0—33,5	32,9
					3. Ausschließlich Proteine.					
10	3	330—340	7,0	50	19.—19.—20.	19,3	20.—20.—20.	20	38,2—34,0—36,8	36,3

Tabelle III.

Versuch	Zu der Basaldiät aus 5 g Fett + 0,5 g Salzgemisch zugefügt:	Zahl der Tauben	Gewicht	Die ersten Bewegungsstörungen erscheinen		Tod		Gewichtsverlust in Proz. des Anfangsgewichts	
				am	im Mittel am	am	im Mittel am	schwankte zwischen	war im Mittel
			g	Tage		Tage		Proz.	
11	A. 2 g Casein	4	238—258	18.—33.	24,5.	19.—39.	29.	38,2—40,1	28,6
	B. 6 g Casein	4	235—270	13.—25.	19,2.	14.—27.	22.	10,1—21,8	17,6
12	C. 2 g Stärke	4	245—256	20.—32.	28,5.	24.—75.	44,5.	26,1—42,3	34,7
	D. 6 g Stärke	4	231—258	22.—34.	26,5.	24.—37.	29,5.	22,2—27,6	25,2

dieser beiden Gruppen bedeutend kürzer als die Lebensdauer der Tauben aus den Versuchen 1 und 2 (Tabelle I), *die ausschließlich Fett erhielten,* und zwar in einer Quantität, die nur um ihren Kalorienbedarf zu decken nötig war.

Im Vergleich zu den mit Fett ernährten Tauben *verkürzte sich die Lebensdauer auch dann, wenn zu der Grundfettkost Stärke zugesetzt wurde* (Gruppe C und D, Tabelle III), wobei die größeren Quantitäten der Stärke, wie es auch zu erwarten war, in höherem Maße die Entwicklung des avitaminösen Zustandes beschleunigten.

Während die Kalorienzahlen, welche die Gruppen A und C erhielten, gleich waren, ebenso wie die Kalorienzahlen, welche die Gruppen B und D bekamen, verstärkte die Anwendung der Proteine (Gruppe A und B) in diesen isokalorischen Rationen die Entwicklung von B-Avitaminose viel bedeutender (trotzdem das Eiweißminimum gesichert war) als die Anwesenheit von Kohlehydraten (Gruppe C und D).

Andererseits hat die Erhöhung der Kohlehydratquote der Diät im größeren Maße als die Erhöhung der Eiweißquote, die Entwicklung der B-Avitaminose beschleunigt (Versuch 12 44,5 und 29,5 Tage; Versuch 11 29 und 22 Tage). Scheinbar kann man bei unserer Versuchsform keine größere Empfindlichkeit des B-avitaminösen Organismus gegen Kohlehydrate als gegen Eiweiß feststellen (s. auch Tabelle I, Versuche 3, 4, 5, 6 und Tabelle II, Versuche 9 und 10); aber jedoch eine andere Versuchsmethode (ein beständiges Quantum von Vitamin B und eine Modifikation des Diätinhaltes) gab *Funk, Collazo* und *Kaczmarek* (27) eine Möglichkeit, festzustellen, daß ein bestimmtes Quantum von B-Vitamin der Taube ein größeres Quantum von Eiweiß als Kohlehydrat zu assimilieren ermöglicht[1]).

Jedenfalls, wie auch in der ersten Serie der Experimente (Tab. I), *störte der Vitaminmangel wesentlich* auch hier *die Äquivalenz der isokalorischen Rationen für den Tierorganismus.*

Diese Beschränkung des isodynamischen Prinzips bei dem avitaminösen Zustande tritt auch in den Forschungen von *Asada* (7) zutage, was auch von *Bickel* (28) hervorgehoben wird — und in bezug auf A- (E ?-) Avitaminose —, wurde eine solche Beschränkung von *Mellanby* (29) bewiesen.

Zur gleichen Zeit bestätigen die auf Tabelle III angeführten Versuche, daß die Erhöhung des täglichen Eiweißbestandteiles der Kost die Entwicklung der B-Avitaminose beschleunigt (Versuch 11).

Dieser Schluß stimmt vollständig mit unseren früheren Beobachtungen bei den Tauben überein (5), ebenso wie auch mit den Versuchen von *Asada* (7)

---

[1]) *Bemerkung während der Korrektur:* Diese Tatsache fand ihre Bestätigung in einer weiteren Arbeit derselben Autoren (*C. Funk* und *J. Collazo,* unter technischer Mitwirkung von *J. Kaczmarek,* Chemie d. Zelle u. Gew. 12, 195, 1925).

an Ratten. In voller Übereinstimmung mit den von uns erreichten Resultate befinden sich auch die Beobachtungen von *Hartwell* (30), welche bewies daß die Milch der stillenden Ratten in vollem Maße dem Bedarf der junge nur in dem Falle entspricht, wenn die Quantität des Vitamins B in de Nahrung der Mutter dem Gehalte derselben an Proteinen proportions ist. Ebenso meinen *Drummond, Crowden* und *Hill* (30), daß die von ihne entdeckte Verzögerung des Wuchses bei den Ratten bei einer eiweißreiche Diät, wie auch der Verlust der Zeugungskraft, nicht infolge eines Über schusses des Eiweißes entstehe, sondern daß diese Erscheinungen als Re sultat einer gestörten Korrelation zwischen Eiweiß und Vitamin B an gesehen werden müssen. Das Bestehen einer Wachstumshemmung der Ratten bei Überfluß des Eiweißes ist auch durch weitere Versuche von *Drummond* und *Reader* (31 a) bestätigt worden.

Schließlich, verkürzte der Zusatz von Hühnereiweiß zum geschälten und gekochten Reis bei Versuchen von *Schaumann* (32) die Lebensdauer der Tauben im Vergleich zu der Lebensdauer derjenigen, die kein Eiweiß erhielten.

Der Widerspruch, welcher zwischen diesen Ergebnissen und den Angaben von *Funk* und *Dubin* und *Abderhalden* über die vitaminsparende Eigenschaft des Eiweißes besteht, rührt augenscheinlich daher, weil bei den früheren Forschungen jene Vitaminverunreinigungen, welche sich stets in den Proteinen finden, nicht genügend in Betracht gezogen wurden. Tatsächlich zeigten die Experimente von *Freedman* und *Funk* (33), *Funk, Freedman* und *Patom* (34), daß die Proteine mit den üblichen Methoden von diesen Vitaminverunreinigungen nicht zu befreien seien. Besonders bezieht sich das auf das Vitamin D. Bei unseren Experimenten aber, wie auch bei denjenigen von *Asada*, wurde das Casein einer hohen Temperatur ausgesetzt, die eine Inaktivierung sogar auch der bedeutend widerstandsfähigeren Vitamine der Gruppe D sicherte.

Mit einer ganz besonderen Vorsicht müssen die Resultate jener Versuche abgeschätzt werden, in denen als Eiweißbestandteil der Diät das Casein diente. Das Casein nämlich repräsentiert jenes Eiweiß, von welchem sich die Vitamine, die sich bei der Koagulation adsorbieren, ganz besonders schwer befreien [*Mueller* (35), *Freedman* und *Funk* (33), *Bond* (36)]. Diese Tatsache wurde nicht immer genügend berücksichtigt, und eben dieser Umstand verdunkelte oft die Resultate der Ernährungsversuche, wie es im Vortrage von *Hopkins* (37) besonders unterstrichen ist.

Auf diese Weise müssen sämtliche Ergebnisse, welche auf die vitaminsparenden Eigenschaften des Eiweißes hinwiesen, nicht auf Kosten der besonderen Eigenschaften der Derivate der Eiweißmoleküle, sondern auf Kosten der Vitaminverunreinigungen bezogen werden. Diese Annahme hat eine Bestätigung in den effektvollen Versuchen von *Freedman* und *Funk* (33) gefunden.

Diesen Ergebnissen entsprechen auch die Resultate der Versuche von *Eijkman* und *Hoogenhuyse* (38), welche bewiesen haben, daß der Zusatz von Casein zur Reisdiät ohne gleichzeitige Vergrößerung ihres Vitamingehalts, weder auf die latente Periode, noch auf den Gewichtsverlust des Tieres eine günstige Wirkung haben.

III.

Aus den Experimenten, die auf Tabelle I und II angeführt sind, folgt, daß, falls irgend ein einziger bestimmter Nahrungsstoff die ganze

Kost der Tauben bildet, die B-Avitaminose dann am günstigsten (im Sinne der Lebensdauer und des Beginns der Bewegungsstörungen) für das Tier verläuft, wenn dieser einzige Nahrungsstoff Fett ist. Eine Vergrößerung der täglichen Fettration (die Erhöhung der Kalorienzahl im Vergleich mit dem Bedarf) hatte keinen merkbaren Einfluß auf die Entwicklung des avitaminösen Zustandes ausgeübt. Ein solcher relativ indifferenter Einfluß des Fettes auf die Entwicklung der B-Avitaminose bei den Tauben war bereits in meinen früheren Mitteilungen angezeigt (5, 38). Und zwar in Fällen, wo die Diät aus zwei organischen Nahrungsstoffen und anorganischen Salzen (bei einer genügenden und gleichen Zahl der Kalorien) bestand, war der Lauf der B-Avitaminose dann am meisten ungünstig, wenn das Fett aus der Diät ganz ausgeschlossen wurde. Die Zusammensetzung aus Fett + Kohlehydraten oder aus Fett + Eiweiß sicherte eine längere Lebensdauer als das Kohlehydrat + Eiweiß (5) (Tabelle V).

Es war für uns deshalb von Wichtigkeit, die Frage zu beantworten, wie sich die verschiedenen Quantitäten von Fetten in Anwesenheit der beständigen Kohlehydrat- und Eiweißquanten zur Entwicklung der B-Avitaminose verhalten. Wir veranstalteten gemeinsam mit Herrn Dr. *B. Solomiani* eine Reihe von Experimenten, bei denen, unter Beibehaltung eines beständigen und minimalen Eiweißquantums (autoklavisiertes Casein) und eines beständigen Kohlehydratquantums (als antiketogenetischen Faktors) das tägliche Fettquantum der drei Taubengruppen verschieden war.

Die erste Serie von Versuchen (13, 14, 15) war im Winter vorgenommen worden. Die Tiere wurden in einem ungeheizten Raum[1]) gehalten, wo die Temperatur der Luft zwischen — 2 und + 2° C schwankte. Diese Versuchsserie wurde an 12 Tauben angestellt, je vier Tauben in jeder Gruppe. Die erste Gruppe (Versuch 13) bekam nur das notwendige Quantum von Kalorien, während die zweite und dritte Gruppe (Versuch 14 und 15) ein überschüssiges Quantum von Kalorien erhielten, wobei dieser Überschuß aus Fett bestand, welches in zunehmenden Dosen hinzugefügt wurde. Als Grundnahrung bekamen die Tauben 2 g Casein, 1 g Stärke und 0,5 g des Salzgemisches und außerdem Fett:

4 g . . . . in Versuch 13
8 g . . . . „ „ 14
15 g . . . . „ „ 15

Die äußeren Versuchsbedingungen (Temperatur des Raumes, Beleuchtung, die Größe des Käfigs usw.) waren für sämtliche Tiere gleich.

Die *Tabelle IV* zeigt die Resultate dieser Experimente.

Aus dieser Versuchsreihe konnten keine endgültigen Schlüsse gezogen werden und darum haben wir im Sommer desselben Jahres eine identische

[1]) Aus Mangel an Heizmaterial.

Serie von Versuchen mit einer gleichen Zahl von Tieren und unter gleich[e]
äußeren Versuchsbedingungen (selbstverständlich mit Ausnahme d[er]
Lufttemperatur) durchgeführt. Die Tauben bekamen 1,5 g Casein, 1
Stärke, 0,5 g des Salzgemisches und außerdem Fett:

3 g . . . . in Versuch 16
6 g . . . . „ „ 17
15 g . . . . „ „ 18

Die Tabelle V zeigt die Resultate dieser Experimente:

Tabelle IV.

Versuch	Nr. der Tauben	Gewicht g	Zu der Basaldiät aus 2 g Casein, 1 g Stärke, 0,5 g Salzgemisch und zugefügtem Fett g	Die ersten Bewegungsstörungen erscheinen am Tage	Tod am Tage	Mittlere Lebensdauer Tage	Gewichtsverlust in Proz. des Anfangsgewichtes
13	64	275	4	31.	33.	22,7	34,9
	65	293		19.	22.		36,9
	66	253		16.	16.		19,4
	67	280		18.	20.		26,9
14	68	278	8	18.	21.	19,7	23,1
	69	306		17.	19.		10,0
	70	288		18.	18.		16,8
	71	276		20.	21.		16,4
15	72	298	15	19.	20.	20,7	14,6
	73	292		20.	22.		Gewichtszunahme 7,5
	76	331		21.	23.		Gewichtszunahme 5,3
	77	313		18.	18.		19,8

Tabelle V.

Versuch	Nr. der Taube	Anfangsgewicht g	Zu der Basaldiät aus 1,5 g Casein, 1 g Stärke, 0,5 g Salzgemisch und zugefügtem Fett g	Die ersten Bewegungsstörungen erscheinen am Tage	Tod am Tage	Mittlere Lebensdauer Tage	Gewichtsverlust in Proz. des Anfangsgewichtes
16	105	232	3	22.	24.	36,7	36,2
	109	208		39.	42.		25,8
	111	220		19.	24.		29,5
	119	234		54.	57.		14,4
17	103	310	6	24.	28.	28,7	19,7
	104	292		27.	34.		11,6
	110	270		23.	25.		12,0
	116	292		26.	28.		30,7
18	115	284	12	25.	27.	33,0	28,2
	117	284		26.	27.		26,2
	118	296		42.	43.		24,5
	120	302		30.	32.		24,7

Die Resultate der Experimente dieser Serie weichen von denen der ersten (Tabelle IV) nur in bezug auf die durchschnittliche Lebensdauer ab. die zweifellos von der äußeren Temperatur abhing. Und darum können wir der Meinung von *Ogata* (40), daß die Erscheinungen von Nervenstörungen im Sommer früher als im Winter sich entwickeln, nicht beistimmen. Eine ausgesprochene Differenz der Lebensdauer bei den Tauben in den Sommerversuchen im Vergleich zu derjenigen der Winterversuche wurde von uns nur da beobachtet, wo die Hauptmasse der Nahrung aus Fett bestand. Wir haben ebenfalls eine ganze Reihe von Versuchen bei niedriger Temperatur des Raumes vorgenommen, wo das Fett die ausschließliche Diät bildete und wir bemerkten, daß die Lebensdauer der Tauben dabei bedeutend kürzer war, als bei den entsprechenden Sommerversuchen, die auf Tabelle I angeführt sind. Bei allen anderen Nahrungsregimen hat die äußere Temperatur keine bestimmte Wirkung gehabt, und in dieser Hinsicht stimmen unsere Beobachtungen mit denjenigen von *Shinoda* (41) überein.

Die Resultate der zweiten Versuchsreihe (Tabelle V) haben die Unbestimmtheit der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe (Tabelle IV) nicht ausgeglichen: sowohl in dem einen wie in dem anderen Falle verringerte in den Versuchen 14 und 17 die Erhöhung der Kalorienzahl auf Rechnung des Fettes die durchschnittliche Lebensdauer.

Weitere Erhöhungen der Kalorienzahl in den Versuchen 15 und 18 verlängerte die Lebensdauer, doch blieb sie kürzer als diejenige, welche die Tiere der Versuche 13 und 16 hattten. Wir haben vorläufig keine Gründe, anzunehmen, daß die Hemmung der Entwicklung von B-Avitaminose in Versuchen 15 und 18 von den vitaminsparenden Eigenschaften des Fettüberschusses abhänge. Trotzdem die zweimal wiederholten Versuche in dieser Beziehung das gleiche Ergebnis lieferten, können nur weitere Experimente der Lösung dieser Frage nähertreten und zeigen, ob hier nicht eine bestimmte Gesetzmäßigkeit bestehe.

Somit *stellte das Fett in den Fällen des isokalorischen Ersatzes in Nahrungsgemischen des einen Nahrungsstoffes durch einen anderen die aller wenigsten Forderungen an das Vitamin B. Ebenso stellt das Fett im Vergleich mit Eiweiß und Kohlehydraten die aller geringsten Forderungen an das Vitamin B der Diät auch dann, wenn die isokalorischen Äquivalente eines jeden von denselben die ausschließliche Kost bilden*, wie es aus Tabelle I folgt. *Wenn aber in den Nahrungsgemischen eine Erhöhung der Kalorienzahl auf Rechnung des Fettes stattfindet, so beschleunigt dieselbe in einem gewissen Maße die Entwicklung der B-Avitaminose.*

Indessen bei Zusatz des Fettes tritt diese Beschleunigung nicht so bestimmt und regelmäßig ein, als wenn eine solche durch die Erhöhung der Eiweiß- oder Kohlehydratenquote verursacht wird. Da die Erhöhung der Kalorienzahl auf Rechnung des Fettes, wo dasselbe die ausschließliche Nahrung bildet, keine bemerkenswerte Einwirkung auf die durchschnittliche Lebensdauer der Tiere ausübt (bei unseren Versuchen bei einer notwendigen Kalorienzahl = 57,4 Tage und bei

einer doppelten Zahl = 56,4 Tage), so hängt offenbar in gewissem Maße eine solche Beschleunigung der B-Avitaminoseerscheinungen bei einer Erhöhung des Fettquantums angesichts des Eiweißes und der Kohlehydrate *eben vom Vorhandensein des Eiweißes und der Kohlehydrate* ab.

Diese relative Indifferenz des Fettes zu der Entwicklung der B-Avitaminose der Tauben findet Bestätigung in einigen Beobachtungen auch bei anderen Autoren. *Collazo* (42) zeigte, daß während die avitaminösen Tiere auf die Einführung von Kohlehydraten mit akuten Nervenerscheinungen reagierten, dieselben keine Reaktion bei Einführung von Fetten zeigten. Die Indifferenz, mit der sich das Fett zur Entwicklung der B-Avitaminoseerscheinungen verhält, ist auch als Grundursache der manchmal beträchtlichen Fettablegungen zu betrachten, welche wir bei den Obduktionen der avitaminösen Tauben, die während ihres Lebens überschüssige Fettportionen erhielten, beobachtet haben.

Es wurde sowohl bei einer ausschließlichen Fettdiät als auch bei einer Diät, in der Kohlehydrate und Eiweiß vorhanden waren, festgestellt. Bei einer Sektion vermochten wir in solchen Fällen sogar makroskopisch die Ablagerung des mit der Nahrung erhaltenen Fettes im Netze, um das Nierenlager, in der Lumbalgegend, manchmal in dem Unterhautzellgewebe, sowie in den verschiedenen Organen zu entdecken. In einem von unseren Versuchen mit den Tauben bei den Dosen von 15 g Fett pro Tag (Taube 73) beobachteten wir sogar, infolge der beträchtlichen Fettablagerung, eine Erhöhung des Körpergewichtes, welches am Todestage das ursprüngliche Gewicht um 7,5 Proz. überstieg. (Anfangsgewicht = 292 g, Endgewicht = 332 g. Der Inhalt des Kropfes und derjenige des Darmkanals = 18,5 g; Tod am 22. Tage.) Zu unserem Erstaunen beobachteten wir eine derartige Ablagerung des Fettes auch bei manchen avitaminösen Tauben, die auschließlich eine Fettdiät bekamen, auch dann, wenn die allgemeine Kalorienzahl bloß aus 50 Proz. des Bedarfs bestand. Die histochemischen Daten werden demnächst ausführlich beschrieben.

Die Fähigkeit der avitaminösen Tauben, das als Zulage zum Reis erhaltene Fett abzulagern und eine geringere Erschöpfung im Vergleich zu denjenigen Tauben, die bloß mit Reis ernährt wurden, darzubieten, war eben auch von *Korenchevsky* (43) bemerkt.

Bei allen unseren Versuchen, ebenso wie auch bei denjenigen der übrigen Forscher, wurde bei den Tauben, die kein Fett oder nur autoklavisierte Gerste erhielten, ein vollständiges Verschwinden des Fettgewebes beobachtet. Es ist zu bemerken, daß *Ogata* (40) manchmal auch in ähnlichen Fällen bei den Hühnern eine Fettablagerung fand,

die eine Zunahme an Gewicht zur Folge hatte. Wir beobachteten niemals eine Fettablagerung auch bei einer reichlichen Ernährung mit Kohlehydraten, was durch einen *Verlust der Eigenschaft des avitaminösen Organismus, Kohlehydrate in Fette umzuwandeln, erklärt werden muß.*

Ein solches relativ indifferentes Verhalten der Fette zur Entwicklung der B-Avitaminose scheint nur dem Vogelorganismus eigentümlich zu sein. Die Diät mit einer hohen Fettquote gibt bei den Ratten den ungünstigsten Verlauf der Avitaminose [*Funk* und *Dubin* (10), *Asada* (7)], und das Gewebe dieser Tiere erleidet den größten Fettverlust gerade eben bei einem Zusatz von Fett zum Nahrungsgemisch [*Asada* (44)]. Daß der Grund der Differenz zwischen unseren Resultaten und denjenigen der anderen Autoren hauptsächlich in verschiedenen Versuchsobjekten (Tauben, Ratten) liegt, wird durch die Versuche von *Funk*, die mit verschiedenen Objekten vorgenommen wurden, bestätigt. Während die Ratten bei einer Diät mit einem hohen Fettgehalt den ungünstigen Verlauf der Avitaminose zeigten [*Funk* und *Dubin* (10)], entwickelte sich bei den Tauben bei einer solchen reichlichen Fettdiät die B-Avitaminose, wie auch in unseren Fällen, am langsamsten (9).

Die Ursache eines solchen Unterschiedes zwischen den Tauben und Ratten in bezug auf den Überschuß des Fettes liegt offenbar — und damit sind wir vollständig mit *Asada* (7) einig — in der Verschiedenheit ihres Stoffwechsels. Der Purinstoffwechsel dieser beiden Tierarten ist verschieden, aber am wichtigsten ist der Umstand, daß auch der Vitaminbedarf der Tauben und Ratten ganz verschieden ist. Während der Bedarf der Tauben an Vitaminen sich *nur auf das Vitamin B beschränkt*, ist der Bedarf an Vitaminen bei den Ratten bedeutend komplizierter. Dieselben bedürfen nicht nur der Vitamine A, B, D, E (betreffs Bedarf an Vitamin C sind die Ansichten geteilt), und nicht nur in der Gruppe des Vitamins B gibt es offenbar von dem Vitamin D verschiedene Stoffe, welche zum Wachsen der Ratten unentbehrlich sind, deren die Tauben aber nicht bedürfen [nach der Nomenklatur von *Euler* und *Lindstål* (45) hD_r], sondern es gelingt überhaupt oft nicht, die jungen Ratten mit den künstlichen Nährgemischen sogar dann großzuziehen, wenn dieselben sämtliche bekannte Vitamine enthalten, weil nicht alle zur Entwicklung der Ratten notwendige Faktoren bekannt sind [*Heaton* (46), *Emmet* und *Mc Kim* (47), *Emmet* und *Luros* (48), *Emmet* und *Stockholm* (49), *Deas* (50)].

Indessen werden die Avitaminoseforschungen gewöhnlich mit jungen Ratten vorgenommen, und deshalb beziehen sich die Ergebnisse, welche in bezug auf den Stoffwechsel auf diesem Wege erhalten wurden, hauptsächlich auf die Zustände, für die wir den Namen **Polyavitaminosen**" (oder *polymorphe Avitaminose)* vorschlagen würden im Gegensatz zu den „**Monoavitaminosen**" (oder *individuellen Avitaminosen)*, bei denen es sich um den Mangel an irgend einem bestimmten Vitamin handelt.

Die größte Zahl der wertvollen Ergebnisse, die im Laboratorium *Bickels* erzielt wurden, beziehen sich ebenfalls, wie es *Bickel* (28) selbst hervorhebt, auf die Resultate einer Ernährung, in welcher alle Vitamine

fehlten. Es unterliegt keinem Zweifel, daß eine ganze Reihe von Widersprüchen betreffs der Wirkung der einzelnen Nahrungsbestandteile auf die avitaminösen Zustände ihren Grund nicht nur in einem verschiedenen Grade der Vitaminverunreinigung haben, wovon bereits oben die Rede war, sondern auch in einer ungleichmäßigen Empfindlichkeit verschiedener Tierarten in bezug auf den Mangel an diesem oder jenem Vitamin.

Die Ergebnisse von *Asada* (7) bezüglich der belastenden Wirkung des Fettes auf die Avitaminoseentwicklung betreffen namentlich die polymorphe Avitaminose, weil seine Ratten entweder sämtlicher Vitamine entbehrten oder mittels Zugabe von Mohrrüben auf einmal A-, B- und C-Vitamine bekamen.

In den Tauben besitzen wir ein glückliches Objekt, welches uns die Möglichkeit gibt, die B-Avitaminose in reinem Zustande zu studieren, indem wir unter dem Ausdruck B-Vitamin das Antiberiberi-Vitamin verstehen. Unsere Schlüsse über die ökonomischen Beziehungen des Fettes zum Vitaminbestand des Organismus beziehen sich somit ***ausschließlich auf das Vitamin B***, ebenso wie auch unsere entgegengesetzten Ergebnisse betreffs des Eiweißes und der Kohlehydrate.

Es ist höchstwahrscheinlich, daß eine solche Überempfindlichkeit der polymorph-avitaminösen Ratten gegen Fettüberschuß noch deswegen entsteht, weil, wie einige Versuche zeigen [*Hamburger* und *Collazo* (51), *Asada* (44)], das Vitamin A eine bedeutende Rolle im Fettstoffwechsel der Säugetiere spielt, während die Tauben das Vitamin A entbehren können. Tatsächlich haben die Ratten in den Versuchen von *Éderer* (12) eine fettreiche Diät bedeutend schlechter vertragen, wenn nur das Vitamin A fehlte, als in dem Falle, wenn das Vitamin B ausfiel. Nichtsdestoweniger bedarf die Frage nach einem Zusammenhang des Vitamins A mit dem Fettstoffwechsel noch weiterer Untersuchung, da einige Autoren einen solchen Zusammenhang in Abrede stellen (*Drummond*) (52).

Jedenfalls ist eine andere Vermutung von *Asada* (7) bezüglich unserer Ergebnisse betreffs des Zusammenhanges von Fett und Vitamin B, die wir in einer unserer früheren Mitteilungen (5) gemacht haben, unserer Meinung nach nicht richtig. *Asada* glaubte annehmen zu dürfen, daß das von uns verwendete Sonnenblumenöl nicht ganz vitaminfrei wäre. Bei den Experimenten, welche *Asada* erwähnt, wurde das Öl im Laufe von 40 Minuten bei 130° erwärmt.

Bei den in dieser Arbeit erwähnten Versuchen hat die Inaktivierung im Laufe von 3 Stunden bei 130° gedauert, und trotz dieses Umstandes hat die Lebensdauer der Tauben, welche das letzterwähnte Öl bekamen, keine Kürzung erlitten, was dann der Fall wäre, wenn die Annahme von *Asada* begründet wäre, sondern sie erwies sich sogar als bedeutend länger, und anstatt 33 bis 36 Tage (5) (Tabelle III), wie es im ersteren Falle war, lebten die Tiere im zweiten Falle 41 bis 57 Tage (Tabelle I). Was eigentlich die Ursache eines mehr ökonomischen Verbrauches des

Vorrats von Vitamin B durch das Fett als durch Eiweiß und Kohlehydrate anbelangt, so benötigt diese Frage noch einer weiteren experimentellen Entscheidung; und eine der Etappen zur Entscheidung derselben liegt zweifellos in der Erforschung der spezifisch-dynamischen Wirkung eines jeden einzelnen Nahrungsstoffes bei der B-Avitaminose, und dies desto mehr, als die relativ mehr indifferente Beziehung des Fettes zum Grundumsatz, als des Eiweißes und der Kohlehydrate durch *Gigon* (53) festgestellt worden ist. In dieser Richtung folgen unsere Experimente.

IV.

Der Charakter des Verlaufes der B-Avitaminose hängt somit von zwei Momenten ab: Einerseits von dem Mangel an Vitaminen selbst und andererseits von der Form der Diät, welche das Tier erhält, wobei das Fett sich sparsamer zum B-Vitaminvorrat des Organismus verhält als Kohlehydrate und Eiweiß.

Der Zusammenhang zwischen den verschiedenen organischen Nahrungsbestandteilen und dem Bedarf an Vitaminen A und C wurde von einer Reihe der Forscher untersucht [*Takahashi* (54), *Mellanby* (29), *Hamburger* und *Collazo* (51), *Hess* (55), *Findlay* (56)]. Es ist auch anzunehmen, daß in der Diät eine bestimmte quantitative Korrelation zwischen den einzelnen Vitaminen existieren müsse [*Frank* (57), *Aron* (58), *Euler* (58a)]. In Anbetracht dessen, daß auf den Verlauf der Avitaminose das Quantum des aufgenommenen Wassers von Einfluß ist [*Eijkman* und *Hoogenhuyse* (38) in bezug auf B-Avitaminose und *Jang* (59) in bezug auf C-Avitaminose)] daß eine Reihe von solchen Bedingungen wie die Temperatur der Umgebung, Beleuchtung, [es ist auch nicht ausgeschlossen, daß auf den Gehalt der Vitamine in der Nahrung das Licht nicht einwirken könnte (*Zilva* 59a, *Špinka* 59b, *Steenbock* 59c u. d, *Euler* 59e u. g)] Arbeit, Alter, Geschlecht [*Simonnet* (60)] und sogar die Farbe des Tieres [*Abderhalden* (61), *Abderhalden* und *Ewald* (3), *Shinoda* (41), *Rohr* (62)] den Verlauf der Avitaminose merklich ändern können, daß schließlich die Resistenz den Avitaminosezuständen gegenüber vielfachen individuellen Schwankungen unterworfen ist, halten wir *die verschiedenen Kombinationen der sämtlichen erwähnten Bedingungen für die Ursache der mannigfaltigen klinischen Formen der Avitaminose*, die bei den Versuchstieren, wie auch in der Pathologie des Menschen vorkommen. Auf diesen Umstand haben schon mehrere Autoren ihre Aufmerksamkeit gerichtet [*Bickel* (28), *Shinodd* (41, 63), *Tscherkes* (26)] und zweifellos dadurch ist es zu erklären, daß *einige Avitaminosezustände sich auch bei der Anwesenheit von Vitaminen in der Diät entwickeln* (falls sie quantitativ selbstverständlich der Belastung der organischen Bestandteile der Diät nicht entsprechen), wie dies bei Kaninchen von *Murata* (64), bei Hühnern von *Tscherkes* (23) und offenbar auch bei den Menschen von *Shinoda* (63) beobachtet wurde (sogenannte Hypovitaminose).

Ein zweites Ergebnis unserer Experimente besteht darin, daß bei dem B-Vitaminhunger das *Prinzip des isodynamischen Ersatzes in seiner Geltung beschränkt* oder vielleicht auch überhaupt unanwendbar

wird, und deshalb müssen in die Formulierung des Isodynamiegesetzes die Daten über den B-Vitamingehalt der Diät inbegriffen werden. Selbstverständlich kann diese Formulierung nur dann verwirklicht werden, wenn es möglich sein wird, entweder die Vitaminquantitäten oder deren biologische Eigenschaften zu messen.

Dieser Schluß bekommt die Bedeutung eines sehr großen praktischen Wertes, weil die isodynamischen Ersätze gewöhnlich entweder am Bette eines Kranken oder bei einer Massenversorgung bei beschränkten Mitteln statthaben. In diesen Fällen ist die Nahrung gewöhnlich gleichzeitig arm an Vitaminen und einseitig, d. h. in einem solchen Zusammenhang der Eigenschaften, wo der Organismus, indem er des Ersatzes einer Energiequelle durch eine andere bedürfte, gleichzeitig eine ausgedrückte Störung desjenigen Mechanismus aufweist, welcher diese Ersätze reguliert. Und tatsächlich ist bei einem Vitaminmangel am vorteilhaftesten eine gemischte Nahrung zu geben [*Asada* (7)].

Zweifelsohne sind diejenigen Ausfallserscheinungen, welche bei der Blockade beobachtet wurden und welche man mit Fettmangel zu verknüpfen suchte, dadurch hervorgerufen worden, daß der Ersatz des Fettes durch andere organische Nahrungsstoffe (hauptsächlich natürlich durch Kohlehydrate) statthatte unter den Bedingungen eines Vitaminmangels.

Zusammenfassung.

1. Die Ergebnisse, die bei einem vollständigen Vitaminhunger der Tauben erzielt worden sind, beziehen sich auf B-Avitaminose.

2. Die Vergrößerung der Protein- und Kohlehydratquote in der Nahrung beschleunigt die Entwicklung der B-Avitaminose.

3. Am indifferentesten zur Entwicklung der B-Avitaminose der Tauben verhält sich das Fett der Nahrung. Die Vergrößerung des Fettquantums in der Diät, die *ausschließlich* aus Fett besteht, wirkt nicht in bemerkbarer Weise auf den Lauf der B-Avitaminose.

Die Vergrößerung des Fettquantums im *Nahrungsgemisch* bei Anwesenheit der Kohlehydrate und Proteine beschleunigt einigermaßen die B-Avitaminoseentwicklung. Diese Beschleunigung ist nicht immer beständig und bestimmt und hängt von der Anwesenheit der Proteine und Kohlehydrate ab.

4. Die Möglichkeit des isodynamischen Ersatzes ist bei einem B-Vitaminmangel wesentlich beschränkt.

5. Es werden vorgeschlagen die Ausdrücke *Polyavitaminose* (oder *polymorphe Avitaminose*) in Fällen eines Hungers an sämtlichen oder an einigen Vitaminen, und *Monoavitaminose* (oder individuelle Avitaminose) bei einem Hunger an einem bestimmten Vitamin.

Literatur.

1) *G. Grijns*, Geneesk. Tijdschr. voor Nederl. Indie 1901. — 2) *N. Hirabayashi*, diese Zeitschr. **146**, 208, 1924. — 3) *E. Abderhalden* und *G. Ewald*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **5**, 1, 1915. — 4) *P. Suski*, diese Zeitschr. **139**, 253, 1923. — 5) *L. Tscherkes*, ebendaselbst **138**, 75, 1922. — 6) *Derselbe*, Verhandl. d. 1. Allrussisch. Kongr. der Pathol. 1924 (russisch). — 7) *K. Asada*, diese Zeitschr. **139**, 234, 1923. — 8) *A. Desgrez* et *H. Bierry*, C. r. de l'Acad. **172**, 1068, 1921; zitiert nach Physiol. Abstr. **6**, 1813, 1921. — 9) *C. Funk*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**, 373 und 378, 1914. — 10) *C. Funk* und *H. Dubin*, Science **52**, 447, 1920. — 11) *E. Abderhalden*, Pflügers Arch. **198**, 571, 1923. — 12) *S. Éderer*, diese Zeitschr. **158**, 197, 1925. — 13) *T. Osborne* und *L. Mendel*, Journ. of biol. Chem. **54**, 739, 1922. — 14) *C. Funk*, Journ. of Physiol. **48**, 228, 1914. — 15) *H. Penan* et *H. Simonnet*, C. r. Soc. Biol. **85**, 198, 1921. — 16) *A. Emmet* and *G. Peacock*, Journ. of biol. Chem. **56**, 679, 1923. — 17) *R. Sogiura* and *S. Benedict*, ebendaselbst **55**, 33, 1923. — 18) *W. Stepp*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **23**, 66, 1923. — 19) *C. Funk* und *Dubin*, Proc. Soc. exper. biol. Med. **19**, 15, 1921. — 20) *E. Mc Collum* and *M. Davis*, Journ. of biol. Chem. **20**, 161, 1915. — 21) *Dieselben*, ebendaselbst **23**, 231, 1915. — 22) *C. Funk* and *A. Macallum*, ebendaselbst **27**, 51, 1916. — 23) *L. Tscherkes*, diese Zeitschr. **143**, 1, 1923. — 24) *Derselbe*, ebendaselbst **149**, 151, 1924. — 25) *E. Abderhalden*, Pflügers Arch. **197**, 105, 1922. — 26) *L. Tscherkes*, Wratschebnoje Dielo 1924, Nr. 8 bis 9 (russisch). — 27) *C. Funk*, *J. Collazo* et *J. Kaczmarek*, C. r. Soc. Biol. **92**, Nr. 12, 997, 1925. — 28) *A. Bickel*, diese Zeitschr. **146**, 493, 1924. — 29) *E. Mellanby*, Experim. rickets. Med. Res. Council. Spec. Rep. Ser. Nr. 61, London 1921. — 30) *G. Hartwell*, Biochem. Journ. **16**, 78, 1922; nach Rep. on the pres. state of knowl. of acces, food factors (Vitamins), Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser. Nr. 38, second edit, London 1924. — 31) *J. Drummond*, *J. Crowden* and *E. Hill*, Journ. of Physiol. **56**, 413, 1922. — 31a) *V. Reader* and *J. Drummond*, Journ. of Physiol. **59**, 472, 1925. — 32) *H. Schaumann*, Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. **14**, Beih. 8, S. 53, 1910. — 33) *L. Freedman* and *C. Funk*, Journ. of metab. Res. **1**, 457 und 469, 1922. — 34) C. *Funk*, *J. Paton* and *L. Freedman*, ebendaselbst **3**, Nr. 1, 1923. — 35) *J. Mueller*, Journ. of Bact. **7**, 309 und 325, 1922. — 36) *M. Bond*, Biochem. Journ. **16**, 479, 1922; zitiert nach Kongreßzentralbl. f. inn. Med. **26**, 258, 1923. — 37) *F. Hopkins*, Journ. Ind. Eng. Chem. **14**, 67, 1922. — 38) *C. Eijkman* und *C. J. van Hoogenhuyse*, Virchows Arch. **222**, 301, 1916. — 39) *L. Tscherkes*, diese Zeitschr. **137**, 121, 1923. — 40) *Ogata*, zitiert nach *Shinoda* (41). — 41) *G. Shinoda*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Mes. **40**, 274, 1924. — 42) *J. Collazo*, diese Zeitschr. **136**, 278, 1923. — 43) *V. Korenchevsky*, Journ. of Pathol. and Bact. **26**, 382, 1923. —44) *K. Asada*, diese Zeitschr. **141**, 166, 1923. — 45) *H. v. Euler* and *J. Lindstål*, Arkiv för Kemi, Mineral. och Geol. **9**, Nr. 12, 1924. — 46) *T. Heaton*, Biochem. Journ. **16**, 800, 1922. — 47) *A. Emmet* and *L. Mc Kim*, Journ. of biol. Chem. **32**, 409, 1917. — 48) *A. Emmet* and *G. Luros*, ebendaselbst **41**, 7, 1920; **43**, 265, 1920. — 49) *A. Emmet* and *M. Stockholm*, ebendaselbst **43**, 287, 1920. — 50) *J. Deas*, ebendaselbst **61**, 5, 1924. — 51) *K. Hamburger* und *J. Collazo*, Klin. Wochenschr. Nr. 37 bis 38, S. 1756, 1923. — 52) *J. Drummond*, Biochem. Journ. **13**, 95, 1919. — 53) *A. Gigon*, Pflügers Arch. **140**, 509, 1911. — 54) *K. Takahashi*, Journ. chem. soc. Japan 48, 651, 1922; zitiert nach Physiol. Abstr. **7**, Nr. 2757. — 55) *A. Hess*, Proc. II Pan.-Amer. Sci. Congr. Wash. **10**, 48, 1917. — 56) *G. Findlay*, Biochem. Journ. **15**, 355, 1921. —

57) *A. Frank*, Monatsschr. f. Kinderheilk. **25**, 147, 1923. — 58) *H. Aron*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 41, S. 2035. — 58a) *H. v. Euler*, Arkiv för Kemi, Miner. och Geol. **8**, N. 9, 1922. — 59) *F. Yang*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **102**, 493, 1924. — 59a) *S. Zilva*, Biochem. Journ. **13**, 164, 1919. — 59b) *Špinka*, diese Zeitschr. **153**, 197, 1924. — 59c) *H. Steenbock* and *Black*, Journ. of biol. Chem. **61**, 405, 1924. — 59d) *H. Steenbock* and *Nelson*, Journ. of biol. Chem. **62**, 209, 1924. — 59e) *H. v. Euler*, *H. Widell* und *E. Erikson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **144**, 123, 1925. — 59g) *H. v. Euler* und *E. Erikson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **146**, 241, 1925. — 60) *H. Simonnet*, Bull. de la Soc. sc. d'hyg. alim. **10**, 356, 1922. — 61) *E. Abderhalden*, Pflügers Arch. **197**, 97, 1922 (XX. Mitt.). — 62) *K. Rohr*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **129**, 248, 1923. — 63) *G. Shinoda*, Zeitschr. f. klin. Med. **100**, 151, 1924. — 64) *M. Murata*, Virchows Arch. **245**, 448, 1923.

Über die physiologische Wirkung des Histidinanhydrids und des Histidyl-histidin-esters.

Von

Takeshi Hosoda.

(Aus dem Sasaki-Laboratorium im Kyoundo-Hospital zu Tokio.)

(Eingegangen am 29. Oktober 1925.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Die Bedeutung der Carboxylgruppe für die intramolekulare Entgiftung ist schon früh erkannt. Stachydrin und Hygrinsäure sind ganz ungiftig; wird aber die entgiftende Carboxylgruppe abgespalten oder außer Funktion gesetzt, so z. B. bei der Überführung des Stachydrins in den Hygrinsäure-methylester, so erweist sich der letztere als Krampfgift[1]). Auch die pharmakodynamisch indifferenten Aminosäuren können bekanntlich durch Abspaltung der Carboxylgruppe in die wirksamen Amine umgewandelt werden.

Die pharmakodynamische Aktivierung der Aminosäuren durch Deckung der Carboxylgruppe wurde von *Minoru Arai*[2]) in unserem Laboratorium konstatiert. Er hat nämlich erwiesen, daß mehr oder weniger aktive Stoffe aus den entsprechenden Aminosäuren auch durch die Veresterung der Carboxylgruppe entstehen können. So ist die Möglichkeit gegeben, daß die indifferenten Aminosäuren je nach der Bindungsweise eventuell in einen pharmakodynamisch aktiven Molekularkomplex übergeführt werden, sobald die hemmende Carboxylgruppe überhaupt in irgend einer Weise abgelenkt wird.

Auf die Veranlassung von Prof. Dr. *Takaoki Sasaki* habe ich es unternommen, diese Überlegung experimentell weiter zu verfolgen.

Da unter den Eiweißbausteinen das Histidin besonders biologisch sehr wirksame Derivate, z. B. Histamin, liefert, und überhaupt der Glyoxalinring reges Interesse beansprucht, habe ich die folgenden Verbindungen zu biologischen Untersuchungen herangezogen:

l-Histidyl-l-histidin, l-Histidin-anhydrid, l-Histidyl-l-histidinmethylester.

---

[1]) Zitiert nach *Guggenheim*, Biol. Amine, S. 227. Berlin 1920.

[2]) *M. Arai*, diese Zeitschr. **186**, 203, 1923.

Das Histidinanhydrid ist zwar schwach wirksam am ausgeschnittenen Darm, Uterus und an Kaninchenohrgefäßen, aber viel schwächer als Histamin. Intravenöse Injektion von 0,07 g Histidinanhydrid pro Kilogramm ist beim Kaninchen ganz unwirksam auf den Blutdruck. Am überlebenden Meerschweinchenuterus wirkt das Histidinanhydrid in einer Konzentration von 1 : 4000 kaum kontrahierend. Die Wirkung des Histidyl-histidin-esters ist ähnlich wie die des Histidin-esters, aber bedeutend schwächer; am überlebenden Meerschweinchenuterus wirkt er in einer Konzentration von 1 : 20000 noch ziemlich deutlich. Bei den Untersuchungen der Blutdruckwirkung konnte man eine auffallende, anfänglich vorübergehende Senkung nicht nachweisen, welche *Arai* (l. c.) bei Histidinester beobachtet hatte. Histidin und Histidyl-histidin waren dagegen in einer Konzentration von 1 : 1000 vollständig inaktiv.

Durch die Verlängerung der Kette, so beim Histidyl-histidin, d. h. durch die Verdoppelung des Imidazolringes, kann somit keine pharmakodynamische Aktivierung hervorgerufen werden. Histidinanhydrid zeigt mehr oder weniger deutliche Wirkung auf die glatten Muskulaturen; sie ist aber so schwach, daß man ihr keine praktische Bedeutung zumessen kann[1]). Das versteht man gut, da die biologisch wichtige Aminogruppe des Histidins bei der Anhydrierung in die wenig wirksame Iminogruppe umgewandelt wird. Infolge der Deckung der Carboxylgruppe bleiben lediglich beide Imidazolkerne unbeeinflußt. Das freie Glyoxalin ist ja nur ganz schwach wirksam[2]). Histidylhistidin-ester wirkt auf die glatten Muskulaturen wie der Histidinester, ist jedoch in quantitativer Hinsicht etwa siebenmal schwächer als der letzte. Mithin wird die pharmakodynamische Wirkung des Aminosäureesters infolge der Verlängerung der Kette abgeschwächt, so in unserem Falle beim Übergang des Histidin-esters in Histidyl-histidinester. Diese Tatsache ist vom rein chemischen Standpunkt schwer zu verstehen. Vielleicht spielt die Veränderung der physikalischen Verhältnisse infolge der Molekülvergrößerung dabei eine wichtige Rolle. Eine ganz ähnliche Erfahrung hat *Guggenheim* früher mit Peptaminen[3]) gemacht.

Experimenteller Teil.

Histidin-anhydrid wurde nach der Methode von *H. Pauly*[4]) hergestellt, aus heißem Wasser umkristallisiert und als Pikrat identifiziert.

[1]) Vgl. *Guggenheim*, diese Zeitschr. **65**, 189, 1914.

[2]) Zitiert nach *S. Fränkel*, Die Arzneimittelsynthese, 5. Aufl., 1921, S. 89; *M. Guggenheim*, Biol. Amine 1920, S. 197; *H. Auvermann*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **84**, 155, 1919.

[3]) *M. Guggenheim*, diese Zeitschr. **51**, 387, 1913.

[4]) *H. Pauly*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **64**, 75, 1910.

Das Histidyl-histidin wurde nach *E. Fischer* und *U. Suzuki*[1]) als Pikrat abgeschieden und dann in salzsaures Salz verwandelt. Das so dargestellte, nicht schön kristallinische Histidyl-histidin-chlorhydrat wurde zweimal, wie üblich durch wasserfreien Methylalkohol und trockenes Salzsäuregas verestert und dann in methylalkoholischer Lösung in der Kälte mit Salzsäuregas nachgesättigt. Beim Stehen im Eisschrank schied sich eine kristallinische Masse ab. Diese Masse trocknete man im Vakuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure und Ätznatron. Für die Analyse wurde die Substanz im Vakuum bei 80° getrocknet:

0,0979 g Substanz: 0,1021 g AgCl.
0,1081 g Substanz: n/10 NH_3 15,4 ccm.

Berechnet für $C_{13}H_{18}O_3N_6 . 3\,HCl$:		Gefunden:
Cl	25,59	25,78 Proz.
N	20,22	19,82 „

Die Analyse stimmt auf Histidyl-histidin-methylester-trichlorhydrat.

a) Einwirkungen auf den Blutdruck.

Versuch 1. Kaninchen, 2000 g. Zur Narkose wurde 1 g Äthylurethan subkutan injiziert. Bei allen weiteren Experimenten wurde Urethannarkose gebraucht. Der Carotisdruck wurde auf einer rotierenden Trommel registriert. 1,5 ccm der 10proz. Histidinlösung[2]) intravenös injiziert, erwiesen sich als unwirksam.

Versuch 2. Kaninchen, 2050 g. 1,5 ccm der 10proz. Histidyl-histidinlösung intravenös eingespritzt. Blutdruck gar nicht beeinflußt.

Versuch 3. Kaninchen, 2100 g. 3 ccm der 5proz. Histidin-anhydridlösung intravenös injiziert, dabei keine besondere Veränderung nachweisbar.

Versuch 4. Kaninchen, 1880 g. 2 ccm der 4proz. Histidyl-histidinesterlösung in die Ohrvene eingespritzt. Zuerst sieht man geringgradige Steigerung des Blutdrucks, der aber nach einigen Minuten allmählich bis zur normalen Höhe sinkt.

Versuch 5. Kaninchen, 2440 g. 2 ccm der 5proz. Histidyl-histidinesterlösung intravenös injiziert. Bei diesem Falle auch eine leichte Blutdrucksteigerung nachweisbar (Abb. 1).

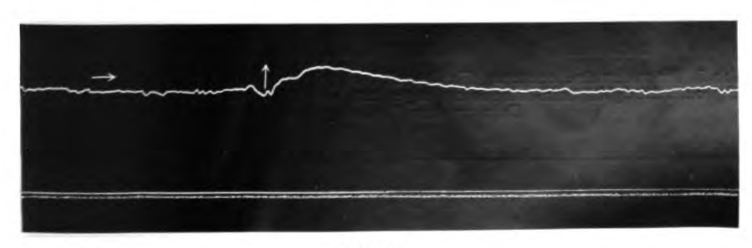


Abb. 1.

[1]) *E. Fischer* und *U. Suzuki*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **38**, 4173, 1905.

[2]) Die Substanzen wurden bei den Experimenten als Chlorhydrat verwendet.

b) Versuche an überlebenden glatten Muskeln.

Man setzt ein ausgeschnittenes, nicht trächtiges Uterushorn in 80 bis 100 ccm der auf 39° C erwärmten, mit Sauerstoff durchperlten *Tyrode*schen Lösung und läßt seine Bewegung mittels eines Hebels auf einer rotierenden Trommel registrieren. Histidinanhydrid bewirkt mehr oder weniger starke Erregung; die minimal wirksame Dosis ist beim Kaninchenuterus 1 : 2,700, beim Meerschweinchenuterus 1 : 4,000 (Abb. 2).

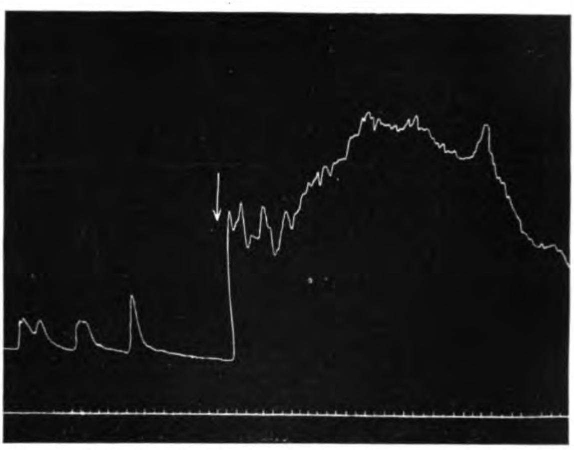


Abb. 2. Meerschweinchenuterus. Zu der durch Pfeil gekennzeichneten Zeit 2 ccm der 1 proz. Histidin-anhydridlösung in 80 ccm *Tyrode*-Lösung zugesetzt.

Der Histidylhistidinester bewirkt starke Kontraktions- und Tonussteigerung (Abb. 3 und 4).

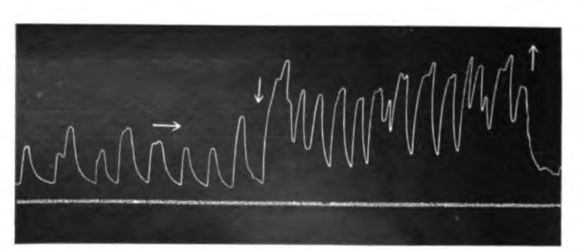


Abb. 3. Meerschweinchenuterus. Zu der mit Pfeil gekennzeichneten Zeit wurde 1 ccm der 0,5 proz. Histidyl-histidin-esterlösung zugesetzt; lebhafte Kontraktion, Tonus gesteigert. Beim zweiten Pfeil ausgewaschen.

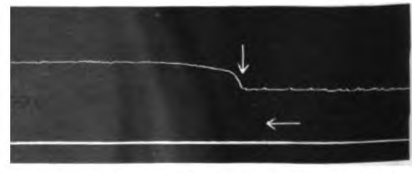


Abb. 4. Kaninchenuterus. Zu der mit Pfeil gekennzeichneten Zeit wurde 1 proz. Histidyl-histidin-esterlösung 1 ccm zugesetzt, Tonus gesteigert. Beim zweiten Pfeil ausgewaschen.

Die minimal wirksame Dosis beim Kaninchenuterus ist 1 : 8,000 bis 10,000, beim Meerschweinchenuterus 1 : 20,000. Histidyl-histidin erwies sich selbst in der Konzentration von 1 : 1,000 als unwirksam.

c) Versuch mit ausgeschnittenen Dünndarmstücken.

Diese Versuche wurden ganz in gleicher Weise wie mit dem Uterushorn ausgeführt. Auf Histidinanhydrid und Histidyl-histidin-ester reagieren Kaninchen- und Meerschweinchendünndarmstücke mit einer leichten Erregung (Abb. 5 und 6).

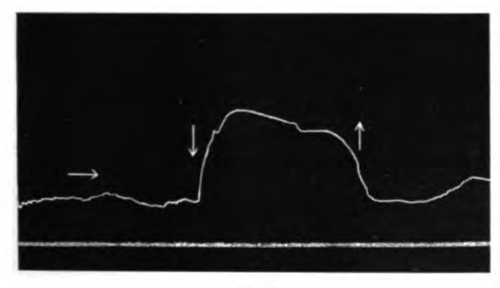


Abb. 5.

Meerschweinchendünndarm. Beim ersten Pfeil 1 ccm von 2 proz. Histidyl-histidin-esterlösung zugesetzt. Tonus gesteigert. Beim zweiten Pfeil ausgewaschen.

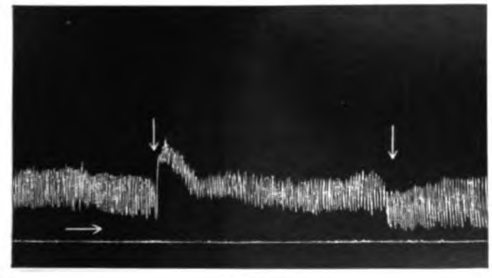


Abb. 6.

Kaninchendünndarm. Beim ersten Pfeil 1 ccm der 2 proz. Histidyl-histidin-esterlösung zugesetzt. Beim zweiten Pfeil ausgewaschen.

d) Durchströmungsversuche nach der Methode von Bissemski.

Zuerst verwendete man *Locke*sche *Lösung* ohne Zuckerzusatz, dann spritzte man 0,5- bis 1,0 proz. Lösung von Histidin, Histidyl-histidin, Histidinanhydrid und Histidyl-histidin-ester mittels einer feinen Nadel durch das Zuleitungsrohr dicht oberhalb der Gefäßkanüle langsam ein, indem man immer die Reaktionsfähigkeit des Präparats vor und nach den Versuchen

mittels einer verdünnten Adrenalinlösung kontrollierte. Histidin und Histidyl-histidin erwiesen sich als unwirksam. Die Gefäßwirkung von Histidinanhydrid und Histidyl-histidin-methylester ergab ein Resultat, das Abb. 7 und 8 zeigt.

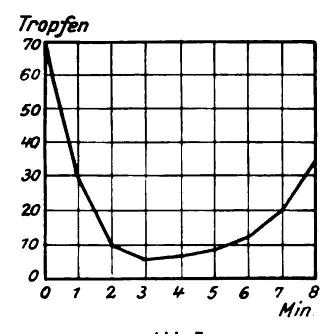


Abb. 7.
0,5 ccm der 1 proz. Histidinanhydrid-lösung injiziert.

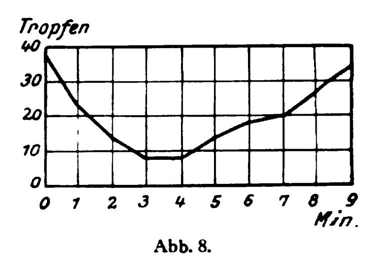


Abb. 8.
0,5 ccm der 1 proz. Histidyl-histidin-ester-lösung injiziert.

Über die Peroxydasefunktion des Oxyhämoglobins.

Von

A. Bach und **A. Kultjugin.**

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 30. Oktober 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Ausgehend von der Annahme, daß ein der pflanzlichen Peroxydase ähnliches Enzym im Blute neben Oxyhämoglobin vorkomme und daß letzteres kochbeständig sei, arbeiteten *A. Bach* und *S. Subkowa* (1) eine Methode aus, welche gestattet, den Peroxydasegehalt minimaler Blutmengen (0,001 ccm) zu messen. Gegen diese Annahme erhoben *R. Willstätter* und *A. Pollinger* (2) den Einwand, daß ihrer Erfahrung nach die peroxydatische Wirkung von Oxyhämoglobinlösungen nach kurzem Aufkochen beträchtlich (beispielsweise auf ein Achtel) herabgesetzt wird. Da uns dieser Einwand als schwerwiegend erschien, entschlossen wir uns, die Frage nach der Existenz einer vom Oxyhämoglobin unabhängigen Peroxydase im Blute näher zu untersuchen.

Die Frage ist nicht neu. *Linossier* (3) und später *Moitessier* (4) stellten fest, daß Leucocyten die bekannte Reaktion auf Peroxydase mit Guajacemulsion und Hydroperoxyd geben. *Moitessier* fand ebenfalls, daß die gleiche Reaktion nicht nur durch das Oxyhämoglobin, sondern auch durch dessen eisenhaltige Abbauprodukte hervorgebracht wird. Diese katalytische Wirkung bleibt auch nach dem Kochen erhalten, während die Peroxydasewirkung der Leucocyten durch Siedehitze vernichtet wird. *E. Czyhlarz* und *O. Fürth* (5) bestätigten die Angaben von *Moitessier* und glaubten, in der Katalyse der Reaktion zwischen Jodwasserstoffsäure und Hydroperoxyd einen Weg zur Unterscheidung der Wirkung der tierischen Peroxydase von der des Oxyhämoglobins gefunden zu haben. Diese Reaktion wird nämlich nicht durch Oxyhämoglobin, wohl aber durch Eiter und lymphoide Gewebe beschleunigt. Dieselben Forscher machten die Beobachtung, daß die Oxydation der Leucobase des Malachitgrüns durch das System Peroxydase + Hydroperoxyd den für Fermentwirkungen charakteristischen Verlauf aufweisen, während es bei dem Oxyhämoglobin nicht der Fall ist. *Bukmaster* (6) bestätigte das verschiedene Verhalten der echten Peroxydase und des Oxyhämoglobins und schlug für letzteres die Bezeichnung „Pseudoperoxydase“ vor. Zu ähnlichen Ansichten betreffend die Verschiedenheit der Wirkung des Oxyhämoglobins und der echten Peroxydase

und die Kochbeständigkeit des ersteren gelangten auch *Pighini* (7), *Senter* (8) u. a.

Nach *Battelli* und *Stern* (9) eignet sich die Katalyse der Reaktion zwischen Jodwasserstoffsäure und Hydroperoxyd nicht zur Unterscheidung der echten Peroxydase von Hämoglobin, da hier die anwesende Katalase auf die Reaktion störend wirkt. Wendet man aber anstatt Hydroperoxyd Äthylhydroperoxyd, auf welches Katalase ohne Wirkung ist, an, so findet man, daß Oxyhämoglobin ebenso wie lymphoide Gewebe die Oxydation der Jodwasserstoffsäure beschleunigen. Dagegen sehen *Battelli* und *Stern* in der Oxydation der Ameisensäure durch Hydroperoxyd in Gegenwart von Blut und verschiedenen Tiergeweben eine Reaktion auf „echte" Peroxydase, obgleich „dieses Oxydationsvermögen des Blutes wenigstens zum größten Teil dem Blutfarbstoff — dem Oxyhämoglobin — zuzuschreiben ist". Die Peroxydase, welche Ameisensäure oxydiert, sei mit derjenigen, welche Jodwasserstoffsäure oxydiert, identisch. *Wolff* und *de Stöcklin* (10) führten den Beweis, daß das Oxyhämoglobin sowohl bei der Oxydation der Jodwasserstoffsäure wie bei der anderer Substrate durch Hydroperoxyd die gleiche katalytische Wirkung, wie die pflanzliche Peroxydase, ausübt. *Willstätter* und *Pollinger* fanden, daß das Oxyhämoglobin das Verhalten und die Wirkung der peroxydatischen Enzyme zeigt, und scheinen sich für dessen Enzymnatur auszusprechen.

Da es uns zunächst auf eine praktische Frage — die Zweckmäßigkeit der Bestimmung der „Peroxydasezahl" des Blutes auf chemischem Wege — ankam, suchten wir festzustellen, ob die peroxydatische Wirkung des Blutes mit der des darin enthaltenen Oxyhämoglobins sich unter allen Umständen völlig deckt. Über die von uns in verschiedenen Richtungen angestellten Versuche wird im nachstehenden berichtet.

I. Blutlösungen von gleicher Färbungsintensität üben gleich große peroxydatische Wirkungen aus.

Blutproben verschiedener Herkunft ergeben meistens bei gleicher Verdünnung mit Wasser Blutlösungen von verschiedener Färbungsintensität und peroxydatischer Kraft. Die Schwankungen der peroxydatischen Wirkungen können auf den verschiedenen Gehalt der Blutproben an Oxyhämoglobin oder — angenommen, daß im Blute eine besondere Peroxydase neben dem Blutfarbstoff existiert — auf den verschiedenen Gehalt der Proben an diesem Enzym zurückgeführt werden. Trifft letztere Annahme zu, so sollte man Blutlösungen begegnen, die bei gleicher Färbungsintensität verschiedene peroxydatische Eigenschaften aufweisen. Versuche mit Menschen- und Kaninchenblut ergaben aber, daß dies nicht der Fall ist.

Von dem umfangreichen Versuchsmaterial sei hier nur folgendes angeführt: Blutproben aus einem Krankenhaus wurden mit destilliertem Wasser auf das 1000fache verdünnt, und die erhaltenen Blutlösungen wurden in vier Reihen ihrer Färbungsintensität nach angeordnet. In jeder Reihe wurden die ungleich gefärbten Lösungen zum Teil durch entsprechende Verdünnung mit Wasser auf die Färbungsintensität der

schwächsten Proben (Nr. 1 jeder Reihe) gebracht. In den ungleich und gleich gefärbten Blutlösungen wurden dann die Peroxydasezahlen nach *Bach* und *Subkowa* bestimmt.

Je 1 ccm der entsprechenden Lösungen wurde mit 1 ccm 0,1 proz. Guajakollösung, 7 ccm Wasser und 1 ccm 1 proz. Hydroperoxydlösung zusammengebracht, und nach 15 Minuten langem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurden die oxydierten Guajakolmengen kolorimetrisch im *Autenrieth*schen Keilkolorimeter bestimmt. Die Peroxydasezahl ist, in Tausendstel Milligramm ausgedrückt, die Guajakolmenge, die unter den angegebenen Bedingungen durch 1 cmm Blut oxydiert wird. In folgender Tabelle sind die erhaltenen Resultate zusammengestellt. Spalte A bezeichnet die ursprünglich ungleich gefärbten Blutlösungen (1 : 1000), Spalte B dieselben Lösungen nach Ausgleich der Färbungsintensitäten durch entsprechende Verdünnung mit Wasser.

Tabelle I.

Peroxydasezahlen von ungleich und gleich gefärbten Blutlösungen (Mensch).

Nr.	1. Reihe		2. Reihe		3. Reihe		4. Reihe	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	36	36	37	36	50	49	31	32
2	42	35	45	37	52	49	46	32
3	46	36	47	36	54	50	51	32
4	52	36	49	38	54	49	52	33
5	54	35	52	36	57	49	56	32
6	61	36	54	36	60	49	59	32

In ganz ähnlicher Weise wurden Versuche mit Kaninchenblut ausgeführt.

Tabelle II.

Peroxydasezahlen von ungleich und gleich gefärbten Blutlösungen (Kaninchen).

Nr.	1. Reihe		2. Reihe		3. Reihe		4. Reihe	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	35	35	38	39	41	41	43	43
2	38	35	42	38	43	41	53	43
3	40	35	42	39	44	41	53	43
4	42	35	47	39	48	39	59	43
5	43	35	53	39	53	39	60	42
6	45	37	67	40	66	40	64	43

Aus obigen Tabellen geht hervor, daß Blutlösungen, welche ursprünglich ungleich gefärbt sind und verschiedene peroxydatische Wirkungen aufweisen, nach Ausgleich der Färbungsintensität genau gleiche Peroxydasezahlen ergeben. Dieser enge Zusammenhang zwischen

Färbungsintensität und peroxydatischer Wirkung spricht gegen die Annahme, daß im Blute neben dem Oxyhämoglobin eine besondere Peroxydase vorkomme.

II. Das Verhältnis Hämoglobinzahl : Peroxydasezahl ist bei Mensch und Kaninchen eine Konstante.

Ist das Oxyhämoglobin das einzige peroxydatische Agens des Blutes, so muß bei Blutproben mit verschiedenem Blutfarbstoffgehalt und verschiedenem peroxydatischen Vermögen zwischen ersterem und letzterem eine direkte Proportionalität bestehen, mit anderen Worten, *das Verhältnis Hämoglobinzahl: Peroxydasezahl muß eine Konstante sein.* Versuche ergaben, daß dies tatsächlich der Fall ist.

Als Beispiel sollen folgende Zahlen angeführt werden:

Tabelle III.

Hämoglobinzahlen nach *Sahli* und Peroxydasezahlen nach *Bach* und *Subkowa* bei Mensch und Kaninchen.

Nr.	Mensch			Kaninchen		
	Hb—Z	P—Z	Hb—Z : P—Z	Hb—Z	P—Z	Hb—Z : P—Z
1	100	61	1,62	90	53	1,69
2	95	54	1,75	105	66	1,59
3	70	42	1,66	73	41	1,78
4	92	52	1,76	75	43	1,74
5	80	46	1,74	80	48	1,66
6	62	36	1,72	76	44	1,72
7	89	54	1,65	83	53	1,56
8	90	54	1,66	96	59	1,62
9	91	54	1,68	96	60	1,60
10	87	50	1,74	101	64	1,57
11	87	52	1,67	84	53	1,58
12	97	60	1,61	70	43	1,62
13	78	45	1,73	79	47	1,66
14	90	52	1,73	68	38	1,78
15	91	54	1,68	72	42	1,71
16	83	47	1,76	72	42	1,71
17	63	37	1,70	89	53	1,67
18	86	49	1,75	101	57	1,77
19	99	59	1,67	74	42	1,76
20	86	51	1,68	68	38	1,78
21	78	46	1,69	68	40	1,70
22	93	56	1,66	63	35	1,80
23	86	52	1,65	75	43	1,74
24	55	31	1,77	76	45	1,69
			Mittel 1,69 {+ 0,08, — 0,06}			Mittel 1,68 {+ 0,12, — 0,11}

Obgleich also der Hämoglobingehalt des Menschen- und Kaninchenblutes in ziemlich weiten Grenzen (etwa um 40 Proz.) schwankt, *erwies sich das Verhältnis Hämoglobinzahl: Peroxydasezahl als auffallend*

konstant. Diesen Befund betrachten wir als endgültigen Beweis dafür, daß *das Oxyhämoglobin das einzige peroxydatische Agens des Blutes darstellt*. Freilich konnte man noch Zuflucht nehmen zu der Hypothese, daß ein der pflanzlichen Peroxydase ähnliches Enzym, mit dem Blutfarbstoff *in konstanten Verhältnissen assoziiert*, im Tierkörper vorkomme und ein einheitliches peroxydatisches Agens vortäusche. Allein eine derartige Hypothese würde zurzeit jeder experimentellen Grundlage entbehren.

III. Vergleichende Versuche über die Eigenschaften des Oxyhämoglobins und der pflanzlichen Peroxydase.

Zwischen der peroxydatischen Wirkung des Oxyhämoglobins und der pflanzlichen Peroxydase besteht in bezug auf die Natur der zu oxydierenden Substrate kein qualitativer Unterschied. Da *Willstätter* und *Pollinger* das Oxyhämoglobin als peroxydatisches Enzym, wenn auch als „schlechtes", ansprachen, schien es uns wünschenswert, die Beeinflussung des Oxyhämoglobins und der pflanzlichen Peroxydase durch verschiedene Faktoren unter möglichst vergleichbaren Bedingungen näher kennenzulernen.

1. Beeinflussung durch erhöhte Temperaturen.

Zweimal umkristallisiertes Oxyhämoglobin (aus Hundeblut) und durch Fällung mit Alkohol gereinigte Peroxydase (aus Meerrettich) wurden in Wasser gelöst, und die erhaltenen Lösungen wurden durch entsprechende Verdünnung mit Wasser auf das gleiche peroxydatische Vermögen gebracht. Letzteres wurde so gewählt, daß 1 ccm jeder Lösung, mit 7 ccm Wasser, 1 ccm Guajakollösung (1 : 1000) und 1 ccm Hydroperoxydlösung (1 : 100) zusammengebracht, bei Zimmertemperatur in 15 Minuten etwa 60 Tausendstel Milligramm oxydiertes Guajacol ergab.

Von jeder Lösung wurde je 1 ccm in vier Probierröhren gegeben und im Thermostaten bei 60° aufbewahrt. Zu bestimmten Zeiten wurde je eine Probe herausgenommen, nach Abkühlung mit 7 ccm Wasser, 1 ccm Guajakollösung und 1 ccm H_2O_2-Lösung versetzt, und nach 15 Minuten langem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde das oxydierte Guajakol in üblicher Weise bestimmt. Ähnliche Versuche wurden auch bei 80 und 99 bis 100° ausgeführt. Sämtliche Versuche wurden noch einmal mit frisch dargestellten Lösungen wiederholt. In Tabelle IV sind die erhaltenen Zahlen angegeben.

2. Beeinflussung durch Säuren.

Es wurden peroxydatisch gleichwertige Lösungen von Blut (Hund), Oxyhämoglobin (Hund) und Peroxydase (Meerrettich) dargestellt. Von den Lösungen wurde je 1 ccm mit Guajakollösung versetzt. Das

Tabelle IV.

Temperatur:	60° C					80° C				99–100° C			
Zeit in Minuten:	0	10	10	20	30	1	10	20	30	1	10	20	30
Oxyhämoglobin I .	62	48	26	24	22	22	20	20	18	24	20	20	17
„ II .	60	48	26	25	20	23	20	20	20	22	19	19	18
Peroxydase I . . .	64	49	41	38	36	37	20	14	6	15	0	0	0
„ II . . .	62	49	40	36	35	36	20	12	7	15	0	0	0

Volumen betrug in allen Fällen 10 ccm, die Normalität der Reaktionsgemische stieg von n/100000 auf n/10 an. Nach 15 Minuten langem Stehenlassen wurde das oxydierte Guajakol in üblicher Weise bestimmt. Proben derselben Lösungen wurden zum Kochen erhitzt und nach Abkühlen in obiger Weise weiter behandelt. Dabei wurden folgende Resultate erhalten.

Tabelle V.

Beeinflussung durch Schwefelsäure.

	Schwefelsäure	0	n/100 000	n/10 000	n/1000	n/100	n/10
Nicht erhitzte Proben	Blut I	60	70	102	60	66	41
	„ II	62	70	100	61	66	42
	Oxyhämoglobin I .	60	67	101	51	67	39
	„ II .	57	64	96	50	65	39
	Peroxydase I . . .	59	52	42	29	0	0
	„ II . . .	63	56	44	27	0	0
Erhitzte Proben	Blut I	21	21	27	40	57	42
	„ II	20	21	29	42	60	44
	Oxyhämoglobin I .	16	16	22	32	52	37
	„ II .	17	17	21	34	53	36
	Peroxydase I . . .	0	0	0	0	0	0
	„ II . . .	0	0	0	0	0	0

Wie aus obiger Tabelle zu ersehen ist, verhält sich die pflanzliche Peroxydase gegen Schwefelsäure anders als Oxyhämoglobin und Blut. Erstere büßt mit steigender Säurekonzentration allmählich ihre Wirksamkeit ein und wird in n/1000 Schwefelsäure ausgeschaltet. Bei Blut- und Hämoglobinlösungen findet dagegen unter dem Einfluß der Säure ein beträchtliches Anwachsen des peroxydatischen Vermögens statt, welches bei n/1000 H_2SO_4 sein Maximum erreicht, um bei n/10 H_2SO_4 etwa auf zwei Drittel der ursprünglichen Wirksamkeit zu sinken. Noch deutlicher ist der Unterschied bei den zum Kochen erhitzten Proben. Während die Wirksamkeit der Peroxydase als völlig aufgehoben erscheint, wird der Rest der Wirksamkeit der erhitzten Blut- und Oxyhämoglobinlösungen unter dem Einfluß der Säure fast auf die ursprüngliche Höhe gebracht um dann in n/10 H_2SO_4 auf den gleichen Wert wie die nicht erhitzten Proben herabzufallen.

Die Ursache der Zunahme des peroxydatischen Vermögens des Oxyhämoglobins liegt wahrscheinlich in der Steigerung des Dispersitätsgrades seiner Lösung unter dem Einfluß der Säure. Oberhalb einer bestimmten Säurekonzentration findet Zerstörung des hochmolekularen Eisenkomplexes unter Abnahme seiner Wirksamkeit statt.

Versuche mit Salzsäure ergaben unter gleichen Bedingungen folgende Resultate.

Tabelle VI.

Beeinflussung durch Salzsäure.

	Salzsäure	0	n/100 000	n/10 000	n/1000	n/100	n/10
Nicht erhitzte Proben	Blut I	61	66	102	62	70	40
	„ II	62	69	101	60	68	42
	Oxyhämoglobin I	60	66	104	57	67	31
	„ II	57	67	101	56	67	38
	Peroxydase I	59	51	42	29	0	0
	„ II	62	50	43	30	0	0
Erhitzte Proben	Blut I	22	25	31	44	57	44
	„ II	21	21	31	45	56	43
	Oxyhämoglobin I	15	19	25	31	46	31
	„ II	18	18	22	34	55	36
	Peroxydase I	0	0	0	0	0	0
	„ II	0	0	0	0	0	0

Das peroxydatische Vermögen des Blutes, des Oxyhämoglobins und der Peroxydase wird durch Salzsäure in der gleichen Weise wie durch Schwefelsäure beeinflußt.

3. *Beeinflussung durch Hydroperoxyd.*

Daß der Blutfarbstoff durch Hydroperoxyd rasch entfärbt und zerstört wird, ist längst bekannt. Es war aber von Interesse, zu ermitteln, wie peroxydatisch gleichwertige Blut-, Oxyhämoglobin- und Peroxydaselösungen sich unter den von uns gewählten Bedingungen gegen Hydroperoxyd verhalten.

Je 1 ccm Blut-, Oxyhämoglobin- oder Peroxydaselösung wird mit 7 ccm Wasser und 1 ccm 1 proz. Hydroperoxydlösung vermischt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wird zu jeder Probe 1 ccm Guajakollösung gegeben und nach Verlauf von 15 Minuten kolorimetriert. Bei den Kontrollversuchen wurde je 1 ccm peroxydatische Lösung mit 7 ccm Wasser vermischt und nach 10 Minuten langem Stehenlassen mit Guajakol- und Hydroperoxydlösung gleichzeitig versetzt. Dabei wurden folgende Zahlen erhalten.

Tabelle VII.

	Blut	Oxyhämoglobin	Peroxydase
Kontrollproben	42	40	40
Mit H_2O_2 belassene Proben	2	1	36

*

Während also die pflanzliche Peroxydase unter den angegebenen Bedingungen durch Hydroperoxyd kaum angegriffen wird, büßt der Blutfarbstoff sowohl im Blute wie in reinem Zustande fast völlig sein peroxydatisches Vermögen ein. Nach einer noch nicht veröffentlichten Untersuchung von *R. Willstätter* und *H. Weber* (2) ist die pflanzliche Peroxydase gegen Hydroperoxyd viel resistenzfähiger als es bisher angenommen worden ist.

Der zeitliche Verlauf der Zerstörung des Blutfarbstoffes durch Hydroperoxyd wurde in der Weise ermittelt, daß den in größeren Mengen dargestellten Reaktionsgemischen nach bestimmten Zeiten Proben entnommen und wie oben angegeben weiter verarbeitet wurden.

Tabelle VIII.

Dauer der H_2O_2-Einwirkungen in Minuten:	0	2	4	6	8	10
Blut	41	27	17	10	4	2
Oxyhämoglobin	40	24	14	6	2	0

Ob bei der Ausführung der Oxydationsreaktion das Guajakol auf das Oxyhämoglobin schützend wirkt, muß dahingestellt bleiben. Zu bemerken ist noch, daß der Blutfarbstoff durch organische Peroxyde ebenso rasch wie durch Hydroperoxyd zerstört wird.

4. *Beeinflussung durch Kohlenoxyd.*

Da das Hämoglobin sich sowohl mit Sauerstoff wie mit Kohlenoxyd vereinigt, wurde auch das Verhalten peroxydatisch gleichwertiger Blut-, Hämoglobin- und Peroxydaselösungen gegen Kohlenoxyd untersucht.

Lösungen von Blut (1 : 1000), Hämoglobin und Peroxydase wurden mit Kohlenoxyd während 15 Minuten bei Zimmertemperatur behandelt. Danach wurde in den nicht behandelten und in den CO-haltigen Proben das peroxydatische Vermögen in üblicher Weise bestimmt. Erhalten:

Tabelle IX.

	Blut	Hämoglobin	Peroxydase
Nicht behandelte Proben	59	64	60
Mit CO „ „	59	64	60

Kohlenoxyd übt also auf das peroxydatische Vermögen des Hämoglobins und der Peroxydase nicht den mindesten Einfluß aus.

5. *Verlauf der Oxydation des Guajakols durch Oxyhämoglobin und Peroxydase in Gegenwart von Hydroperoxyd.*

Wie eingangs erwähnt, machten *E. v. Czylarz* und *O. v. Fürth* (5) die Beobachtung, daß die Oxydation der Leucobase des Malachitgrüns

durch pflanzliche Peroxydase in Gegenwart von Hydroperoxyd eine für Fermentwirkungen charakteristische Kurve aufweist, während bei der Oxydation der gleichen Leucobase mit Oxyhämoglobin dies nicht der Fall ist. Wir haben den Verlauf der von uns benutzten Reaktion bei peroxydatisch gleichwertigen Oxyhämoglobin- und Peroxydaselösungen messend verfolgt und dabei nachstehende Zahlen erhalten:

Tabelle X.

Zeit in Minuten:	1	3	5	7	9	11	13	15
Oxyhämoglobin I	47	69	72	74	74	74	74	74
„ II	45	69	71	74	74	74	74	74
Peroxydase I	12	37	55	61	64	66	68	69
„ II	11	39	55	60	64	66	67	69

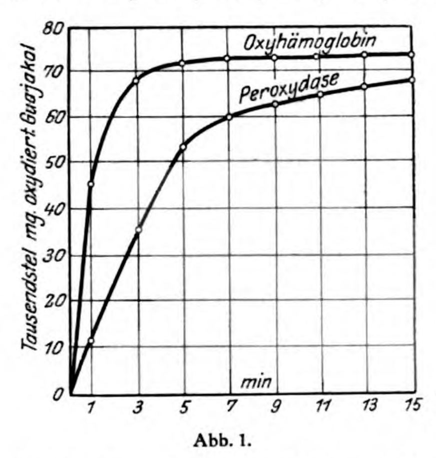


Abb. 1.

In vorstehender Abbildung sind die Zahlen in Kurvenform wiedergegeben. Daraus ergibt sich mit voller Bestimmtheit, daß zwischen dem Oxyhämoglobin und der Peroxydase in bezug auf den Verlauf der peroxydatischen Wirkung kein prinzipieller Unterschied besteht.

IV. Versuch, die pflanzliche Peroxydase an Oxyhämoglobin zu adsorbieren.

In der Hoffnung, eine etwaige Affinität zwischen dem Oxyhämoglobin und der pflanzlichen Peroxydase zu finden, versuchten wir, letzteres an ersteres zu adsorbieren.

Hundeerythrocyten wurden teils in reinem, teils in peroxydasehaltigem Wasser gelöst, und die Lösungen wurden der Kristallisation in üblicher Weise überlassen. Die Kristalle beider Art wurden in Wasser gelöst und aus den erhaltenen Lösungen, sowie aus den beiden Mutterlaugen wurden durch entsprechende Verdünnung mit Wasser Proben von gleicher Färbungsintensität dargestellt und das peroxydatische Vermögen wie früher ermittelt.

Tabelle XI.

	Oxyhämoglobin aus		Mutterlaugen	
	reinem Wasser	peroxydasehaltigem Wasser	reines Wasser	peroxydasehaltiges Wasser
Probe Ia	32	33	33	54
„ Ib	32	32	32	54
„ IIa	75	75	75	94
„ IIb	76	76	75	94

Aus obigen Zahlen geht hervor, daß in Gegenwart von pflanzlicher Peroxydase auskristallisiertes Oxyhämoglobin schon nach der ersten Kristallisation das gleiche peroxydatische Vermögen wie unter gewöhnlichen Bedingungen kristallisiertes aufweist, während die zugesetzte Peroxydase in den Mutterlaugen verbleibt. Pflanzliche Peroxydase wird also nicht von Oxyhämoglobin adsorbiert.

V. Besprechung der Ergebnisse.

Die Wahrnehmung, daß auf die gleiche Färbungsintensität gebrachte Blutlösungen stets das gleiche peroxydatische Vermögen aufweisen und daß bei Blutproben mit verschiedenem Gehalt an Farbstoff das Verhältnis *Oxyhämoglobinzahl*: *Peroxydasezahl* stets eine Konstante ist, läßt der Annahme keinen Raum mehr, daß im Blute neben dem Hämoglobin ein der pflanzlichen Peroxydase ähnliches Enzym vorkomme. Die peroxydatische Wirkung des Blutes deckt sich mit der des darin enthaltenen Oxyhämoglobins restlos. Da man nunmehr von der Hämoglobinzahl unter Zugrundelegung eines bestimmten Koeffizienten auf die Peroxydasezahl schließen kann, so ist die Bestimmung der letzteren auf chemischem Wege aussichtslos. In beiden Fällen kommt es auf kolorimetrische Bestimmungen an, und natürlich ist das direkte Kolorimetrieren des Oxyhämoglobins nach *Sahli*, als einfacheres, demjenigen der Oxydationsprodukte des Guajacols oder eines anderen Substrates vorzuziehen. Weniger klar gestaltet sich die Frage nach der Natur der peroxydatischen Agenzien der Milch, der Leucocyten usw. Ob hier eisenhaltige Abkömmlinge des Blutfarbstoffes oder echte Peroxydasen vorliegen, bedarf einer weiteren Erforschung.

Großes Interesse beansprucht ferner die Frage nach der Möglichkeit, das Oxyhämoglobin in die Kategorie der biologischen Katalysatoren oder Fermente einzureihen. Sind dazu hinreichende Gründe vorhanden, so hat man im Oxyhämoglobin den ersten, wenn auch längst bekannten Fall *eines chemisch wohl definierten, aus dem lebenden Organismus in fast unverändertem Zustande isolierbaren Enzyms*. Nun entspricht das Verhalten des Oxyhämoglobins im großen und ganzen den Anforderungen der Definition der Enzyme. Es ist unverkennbar ein

Katalysator, und ein biologischer, von der lebenden Zelle erzeugter Katalysator. Es ist thermolabil, wenn auch in beschränktem Maße. Letzteres kann aber nicht gegen seine Enzymnatur eingewendet werden, da die Thermolabilität kein absolutes Kennzeichen der Enzyme darstellt. Der eine von uns (*Bach*) hat ein durch Ultrafiltration gereinigtes Peroxydasepräparat aus Meerrettich in den Händen gehabt, welches auch durch anhaltendes Kochen nicht zur vollen Inaktivität gebracht werden konnte[1]). In einer demnächst zu veröffentlichenden Untersuchung von *A. Bach* und *A. Oparin* wird bewiesen, daß mehrere Enzyme nach völliger Inaktivierung durch Hitze unter bestimmten Bedingungen ihre Wirksamkeit zum größeren oder minderen Teile wiedergewinnen. Weniger vereinbar mit den üblichen Vorstellungen über die Eigenschaften der Enzyme ist das Verhalten des Oxyhämoglobins gegen Säuren. Im Gegensatz zu der pflanzlichen Peroxydase, welche schon in n/100 Schwefelsäure völlig vernichtet wird, behält das Oxyhämoglobin bei dieser Säurekonzentration noch seine ursprüngliche Wirksamkeit bei und büßt nur etwa ein Drittel der letzteren in n/10 Schwefelsäure ein. Dies sind aber quantitative, nicht qualitative Unterschiede, da die pflanzliche Peroxydase ihrerseits verhältnismäßig hohe Säurekonzentrationen verträgt. Zieht man noch in Betracht, daß in bezug auf die Kinetik der peroxydatischen Wirkung entgegen der Annahme von *Fürth* und *Czyhlarz*, zwischen dem Oxyhämoglobin und der pflanzlichen Peroxydase kein Unterschied besteht, so wird man zu dem Schluß gelangen, daß der Auffassung des Oxyhämoglobins als peroxydatisches Enzym nichts im Wege steht.

Literatur.

1) *A. Bach* und *S. Subkowa*, diese Zeitschr. **125**, 283, 1921/22. — 2) *Willstätter* und *Pollinger*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **130**, 281, 1923. — 3) *Linossier*, C. r. soc. biol. **50**, 373, 1898. — 4) *Moitessier*, ebendaselbst **57**, 373, 1904. — 5) *E. Czyhlarz* und *O. Fürth*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **10**, 358, 1907. — 6) *G. A. Buckmaster*, Journ. of Physiol. **37**, 1908. — 7) *G. Pighini*, Arch. di fisiologia **4**, 67, 1907. — 8) *G. Senter*, The Journ. of physiol. **36**, 1907. — 9) *F. Battelli* und *L. Stern*, Biol. Zeitschr. **13**, 44, 1908. — 10) C. r. **151**, 483, 1910.

---

[1]) Nicht veröffentlichte Beobachtung.

Über die Katalaseeigenschaft des Oxyhämoglobins.

Von

A. Kultjugin.

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 30. Oktober 1925.)

Wu teilt in seiner Arbeit (The catalase activity of hemoglobin and derivates, I) mit, daß Hämoglobin und alle seine eisenhaltigen Derivate die Eigenschaft, Wasserstoffsuperoxyd zu spalten, besitzen, und da die Katalasewirkung sich auf Erythrocyten beschränkt, so glaubt er, daß die Katalasefunktion des Blutes mit dem Hämoglobin eng verbunden sei.

Beim Arbeiten mit kristallinischem Oxyhämoglobin in einer anderen Richtung beobachtete ich, daß das Oxyhämoglobin entweder gar keine oder nur eine ganz geringe zersetzende Einwirkung auf Wasserstoffsuperoxyd ausübt. Um diese Tatsache aufzuklären, habe ich eine Reihe von Versuchen angestellt.

Das Oxyhämoglobin wurde nach *Hoppe-Seyler* auf folgende Weise gewonnen. Das defibrinierte Blut wurde zentrifugiert, das Serum abgehoben und die Erythrocyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die gewaschenen Erythrocyten wurden in einer kleinen Menge Wasser (bei 37°) aufgelöst, und nach Abkühlen auf 0° wurde ein Halbvolumen Äther zugefügt; die Mischung wurde während 5 Minuten stark geschüttelt und dann scharf zentrifugiert. Die untere durchsichtige Lösung des Oxyhämoglobins wurde mit einer Pipette in ein Becherglas abgesaugt und dazu $^1/_3$ Volumen Äthylalkohol bei 0° nach und nach zugefügt. Die Flüssigkeit läßt man in einer Kältemischung zur langsamen Kristallisation stehen. Die Oxyhämoglobinkristalle wurden von der Mutterlauge abzentrifugiert und auf einer porösen Tonplatte abgepreßt. Durch wiederholte Umkristallisation (bis viermal) wurden Oxyhämoglobinkristalle von verschiedener Reinheit gewonnen. Auf diese Weise vorbereitetes Oxyhämoglobin wurde auf sein Vermögen, Wasserstoffsuperoxyd zu spalten, untersucht.

Oxyhämoglobinlösungen verschiedener Reinheit (ein-, zwei-, drei- und viermal kristallisiert) wurden hergestellt und durch Verdünnung mit destilliertem Wasser auf die gleiche Färbungsintensität, wie Blutlösungen 1 : 1000 gebracht. Die Katalasezahl dieser Proben und die-

jenige der Blutlösungen wurde nach *Bach* und *Subkowa* (2) bestimmt. Die erhaltenen Resultate sind aus Tabelle I zu ersehen.

Tabelle I.

Blutlösung 1:1000	Oxyhämoglobinlösung, einmal kristallisiert	Oxyhämoglobinlösung, zweimal kristallisiert	Oxyhämoglobinlösung, dreimal kristallisiert	Oxyhämoglobinlösung, viermal kristallisiert
16,2	0,85	0	0	0
14,8	0,77	0	0	0

Die Mutterlaugen wurden ebenso auf das Vermögen, Wasserstoffsuperoxyd zu spalten, geprüft. Es zeigte sich, daß nach der ersten und zweiten Umkristallisation die Mutterlauge noch das katalytische Vermögen besitzt, während nach der dritten und vierten Umkristallisation es ihnen völlig fehlt. Auch konzentrierte Oxyhämoglobinlösungen von Kristallen der dritten und vierten Kristallisation spalten Wasserstoffsuperoxyd nicht.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß das Oxyhämoglobin bei wiederholter Umkristallisation das Vermögen, Wasserstoffsuperoxyd zu spalten, einbüßt. Verminderung der Aktivität des Oxyhämoglobins bei seiner Umkristallisation haben auch *Willstätter* und *Pollinger* (3) beobachtet.

Ich benutze zur Trennung des Hämoglobins vom Blute auch die Chloroformmethode.

Die reingewaschenen Blutkörperchen wurden durch Zentrifugieren vom Serum getrennt, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, in zehnfachem Volumen destillierten Wassers hämolysiert und durch Papierfilter filtriert. Zur filtrierten Lösung wurde ein Fünftel Volumen Chloroform zugesetzt und während 10 Minuten stark geschüttelt und dann wieder zentrifugiert. Im Zentrifugierglas sieht man drei Schichten: oben eine klare und fast farblose, wässerige Lösung, unten die Chloroformschicht und dazwischen eine einer Tablette ähnliche Masse von gefälltem Hämoglobin.

Die klare, farblose Lösung wurde mit destilliertem Wasser 65mal verdünnt und dann ihre Katalasezahl nach *Bach* und *Subkowa* bestimmt. Sie zeigte sich gleich 18. Das ausgefällte Hämoglobin wurde in einer kleinen Porzellanschale mit Wasser verrieben, die Emulsion wurde abzentrifugiert und die Flüssigkeit vom Sediment abgehoben. Nach vielfacher Wiederholung dieser Operation wurde das Hämoglobin auf sein Vermögen, Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen, untersucht. Es zeigte sich dabei, daß das Hämoglobin — obwohl in großen Mengen genommen — spurenweise Wasserstoffsuperoxyd spaltet. Bei der Chloroformmethode der Trennung des Hämoglobins aus der Erythro-

cytenlösung befindet sich die Katalase also in der klaren, wässerigen Lösung. *M. Tsuchihashi* (4) bekam in solchen wässerigen, von Hämoglobin freien Lösungen bis zu 74 Proz. des ursprünglichen Katalasevermögens des Blutes.

Wenn die Katalasewirkung des Blutes an den Farbstoff gebunden wäre, so sollte man erwarten, daß die Katalasezahl sich dem Farbstoffgehalt des Blutes entsprechend verändern würde. Versuche zeigten aber, daß dies nicht der Fall ist. Aus dem Blute verschiedener Herkunft wurden Blutlösungen (1 : 1000) hergestellt. Zu gleicher Zeit wurde die Katalasezahl dieser Proben nach *Bach* und *Subkowa* und der Hämoglobingehalt des Blutes nach *Sahli* bestimmt. Die Resultate sind aus Tabelle II zu ersehen.

Tabelle II.

Blut	1	2	3	4
Hämoglobingehalt nach *Sahli*	86	82	85	82
Katalasezahl nach *Bach* und *Subkowa* .	15,1	14,6	9,3	2,6

Man sieht also, daß zwischen dem Hämoglobin- und Katalasegehalt keine konstante Beziehung besteht.

Zusammenfassung.

1. Lösungen von vielfach umkristallisiertem Oxyhämoglobin weisen keine Katalaseeigenschaft auf.
2. Das aus Erythrocytenlösung mit Chloroform ausgefällte Hämoglobin spaltet nur spurenweise Wasserstoffsuperoxyd, während das klare, hämoglobinfreie Filtrat imstande ist, sehr energisch Wasserstoffsuperoxyd zu spalten.
3. Es besteht keine konstante Beziehung zwischen dem Hämoglobingehalt des Blutes und dem Katalasevermögen des letzteren.
4. Aus obigen Versuchen geht hervor, daß die Katalaseeigenschaft des Blutes in keinem Zusammenhang mit seinem Farbstoff steht, was mit den Ergebnissen *Senters* (5) übereinstimmt.

Literatur.

1) *H. Wu*, Journ. of biochem. 2, 195, 1923. — 2) *A. Bach* und *S. Subkowa*, diese Zeitschr. 125, 283, 1922. — 3) *R. Willstätter* und *Pollinger*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 130, 287, 1923. — 4) *M. Tsuchihashi*, diese Zeitschr. 140, 63, 1923. — 5) *G. Senter*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 257, 1903.

Über die Abnahme der Katalasewirkung des Blutes beim Aufbewahren.

Von

A. Kultjugin.

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 30. Oktober 1925.)

Die Methode der Bestimmung der Fermentzahlen des Blutes nach *A. Bach* und *S. Subkowa* (1) hat eine große Verbreitung gewonnen nicht nur bei experimentellen und biologischen Untersuchungen, sondern auch in der Klinik. Dieses ist erklärbar, da die Bestimmungen eine minimale Blutmenge erforderen.

Nach den Literaturangaben (2) sowohl wie nach unseren eigenen Erfahrungen nimmt die Katalasezahl beim Aufbewahren des Blutes in vitro allmählich ab. Da unter den Umständen der klinischen Arbeit die Bestimmungen erst einige Stunden nach der Blutentnahme geschehen, so schien es mir wünschenswert und von praktischem Interesse, die Veränderung der Katalaseaktivität des Blutes beim Aufbewahren quantitativ zu verfolgen. Die Bestimmungen wurden mit Menschen-, Kaninchen- und Meerschweinchenblut angestellt.

Die Bestimmungen wurden genau nach der ursprünglichen Vorschrift von *Bach* und *Subkowa* ausgeführt. Um der Temperaturkonstanz während der Versuchszeit sicher zu sein, wurden sämtliche Proben sowohl wie die Blutlösung (1 : 1000) im Wasserbad bei 17° aufbewahrt.

Was die Genauigkeit der Methode anbelangt, so beträgt der Versuchsfehler bei Parallelversuchen höchstens 0,1 ccm n/10 Permanganatlösung. Die Resultate der Versuche sind in den Tabellen I bis III zusammengestellt.

Tabelle I.

Menschenblut.

Nr.	Katalasezahl			Abnahme der Katalasewirkung in Proz.	
	sogleich nach der Blutentnahme	nach $2^1/_2$ Stunden	nach 5 Stunden	nach $2^1/_2$ Stunden	nach 5 Stunden
1	18,2	17,2	16,7	5,5	8,2
2	20,9	20,3	20,1	2,9	3,9
3	19,3	18,4	18,3	4,7	5,2
4	21,5	21,3	21,1	1,0	1,9
5	19,4	19,0	18,5	2,1	4,7
6	20,0	19,4	19,2	3,0	4,0
7	17,8	17,3	16,8	2,8	5,6
8	15,1	14,4	13,9	4,6	7,9
9	19,4	18,6	18,3	4,1	5,7
10	16,0	15,6	15,4	2,5	3,8
11	16,9	16,2	15,9	4,2	5,9
12	20,2	19,8	19,7	2,0	2,5
13	18,2	17,6	17,3	3,4	5,0
14	16,2	15,9	15,6	1,9	3,7
15	20,0	19,6	19,2	2,0	4,0
16	21,1	20,6	20,4	2,4	3,3
17	20,1	19,6	19,1	2,5	5,0
18	12,5	11,6	11,0	7,2	12,0
19	17,7	17,3	17,2	2,3	2,8
20	15,3	14,8	13,7	3,3	10,5
21	17,0	16,6	16,2	4,0	6,4
22	19,6	19,0	18,7	3,1	4,6
23	16,7	16,2	16,8	3,0	5,4
24	20,6	20,1	19,7	2,5	4,4
25	19,2	18,5	18,3	3,7	4,7
26	18,4	17,6	16,9	4,3	8,2
27	20,3	19,6	19,1	3,5	5,4
28	16,7	16,0	15,7	4,2	6,3
29	20,4	19,9	19,5	2,5	4,4
30	19,7	19,1	18,5	3,0	5,4
			Mittelwert:	3,3	5,4

Tabelle II. Kaninchenblut.

Nr.	Katalasezahl			Abnahme der Katalasewirkung in Proz.	
	sogleich nach der Blutentnahme	nach $2^1/_2$ Stunden	nach 5 Stunden	nach $2^1/_2$ Stunden	nach 5 Stunden
1	18,4	18,1	17,3	1,7	6,0
2	18,8	18,3	17,6	2,7	6,9
3	21,0	19,7	19,4	2,0	3,5
4	18,0	17,4	17,0	3,3	5,6
5	16,2	15,3	14,9	5,6	8,0
6	19,3	18,6	17,0	3,6	11,9
7	14,3	13,2	11,4	7,7	20,3
8	15,9	14,8	13,3	6,9	16,4
9	14,8	13,7	12,3	6,8	16,9
10	17,9	16,5	15,5	7,8	13,4
11	14,7	13,4	12,5	8,8	15,0
12	18,3	17,0	15,7	7,7	14,2
13	20,1	19,6	18,5	2,5	8,0
14	14,5	14,1	12,9	2,8	11,0
15	14,5	13,3	11,6	8,3	20,0
16	19,6	19,2	18,3	2,1	6,6
17	15,7	15,0	13,9	4,5	11,5
18	13,2	11,9	10,6	9,8	19,7
19	16,6	15,1	14,1	9,0	15,0
20	13,8	12,3	10,9	10,9	21,0
21	16,2	15,6	15,1	3,1	6,8
22	12,2	11,7	10,7	4,1	12,3
23	19,0	17,9	17,2	5,8	9,5
24	15,5	15,0	14,5	3,2	6,5
25	13,0	12,2	11,9	5,4	8,5
26	17,9	17,3	16,9	3,4	5,6
27	16,5	15,5	14,1	6,1	14,5
28	18,5	17,5	16,5	5,4	10,8
29	19,6	18,7	18,2	4,6	7,0
30	17,3	16,2	15,5	6,4	10,4
31	18,5	17,7	17,1	4,3	7,6
32	18,9	17,5	16,7	7,4	11,6
			Mittelwert:	5,4	11,3

Tabelle III. Meerschweinchenblut.

Nr.	Katalasezahl			Abnahme der Katalasewirkung in Proz.	
	sogleich nach der Blutentnahme	nach 2½ Stunden	nach 5 Stunden	nach 2½ Stunden	nach 5 Stunden
1	15,3	13,4	11,6	12,4	24,2
2	7,6	6,9	6,0	9,2	21,1
3	2,6	2,4	2,0	7,7	23,0
4	14,6	12,6	11,2	13,7	23,3
5	13,9	11,6	10,5	16,5	24,5
6	15,1	13,6	11,6	9,9	23,2
7	14,5	13,1	11,5	9,7	20,7
8	9,1	8,0	7,1	12,1	22,0
9	13,9	11,5	10,2	17,3	26,6
10	9,4	7,9	7,1	16,0	24,5
11	8,4	7,2	6,0	14,3	28,6
12	16,2	12,8	11,9	21,0	26,5
13	17,3	13,3	11,9	23,1	31,3
14	3,7	2,9	2,6	21,6	29,7
15	18,2	14,1	13,4	21,4	26,4
16	3,7	3,1	2,7	16,2	27,2
17	3,9	3,1	2,8	20,5	28,2
18	11,2	10,2	9,3	8,9	17,0
19	9,9	8,5	7,5	14,2	24,3
20	16,9	15,1	13,8	10,7	18,3
21	16,7	14,3	13,4	14,4	19,8
22	17,7	15,8	14,5	10,8	18,1
23	10,5	9,5	8,5	9,5	19,1
			Mittelwert:	14,4	23,8

Aus diesen Tabellen ist zu ersehen, daß beim Aufbewahren des Blutes bei Zimmertemperatur (17°) die Aktivität der Katalase allmählich abfällt. Diese Abnahme der Katalasewirkung beträgt im Mittel bei Menschenblut während der ersten 2½ Stunden 3,3 Proz. und nach 5 Stunden 5,4 Proz., bei Kaninchenblut 5,4 und 11,3 Proz. und bei Meerschweinchenblut 14,4 und 23,8 Proz.

Literatur.

1) *A. Bach* und *Subkowa*, diese Zeitschr. 125, 128, 1921. — 2) *O. Steppuhn* und *A. Timofejewa*, ebendaselbst 186, 213, 1921.

Zur Frage nach dem experimentellen Skorbut der Meerschweinchen.

Von

N. Schepilewskaja und N. Jarussova.

(Aus dem wissenschaftlichen Institut für Ernährungsphysiologie des Volksgesundheitskommissariats in Moskau.)

(Eingegangen am 23. Oktober 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Gegenwärtig steht es fest, daß neben den bekannten Nahrungsstoffen der Organismus in geringer Menge auch Verbindungen braucht, welche Vitamine genannt werden. Allein eine nähere Beleuchtung dieser Frage kann man nur erwarten, wenn es klargestellt sein wird, welche Rolle diese Verbindungen in dem allgemeinen Stoffwechsel spielen.

Es ist bekannt, daß für die Nahrungsmittel, welche die Quelle der Vitamine darstellen, ihre Fähigkeit charakteristisch ist, dem Eintritt der Avitaminose vorzubeugen und die Symptome einer schon eingetretenen Erkrankung zu heilen. Im Zusammenhang damit haben wir in unserer Arbeit aufzuklären versucht, welche Wirkung die verschiedenen Dosen eines der Antiskorbutmittel, nämlich des Kohls, beim Skorbut der Meerschweinchen ausüben, und haben bei drei von unseren Versuchstieren die Untersuchung des Stickstoffwechsels ausgeführt.

Seit den klassischen Untersuchungen von *Holst* und *Fröhlich*[1]) ist es festgestellt, daß bei einseitiger Ernährung mit Getreidesamen und deren Produkten bei den Meerschweinchen eine besondere hämorrhagische Erkrankung entsteht, welche dem Skorbut des Menschen ähnlich ist. Eine ganze Reihe von Nahrungsmitteln, unter anderen auch Kohl, haben einen günstigen Einfluß auf die Vorbeugung und Heilung dieser Krankheit.

[1]) *Axel Holst* und *Th. Fröhlich*, Journ. of Hyg. 7, 634, 1907; Zeitschr. für Hyg. und Infektionskrankh. 72, 1, 1912.

Unsere Beobachtungen erstrecken sich über zehn Meerschweinchen, deren Nahrung aus Hafer allein oder aus Hafer mit einer Beimischung verschiedener Dosen von Kohl bestand. Täglich wurde jedes einzelne Meerschweinchen gewogen und eine genaue Berechnung der von jedem Tiere verbrauchten Nahrung aufgestellt. Nur bei zwei Versuchen mit ausschließlicher Haferernährung konnte man die Menge der aufgefressenen Nahrung nicht genau berechnen (Meerschweinchen Nr. 9 und 10), da denselben auf 24 Stunden in Wasser eingeweichter Hafer gegeben wurde, welcher dann austrocknete und oft durch die Meerschweinchen selbst verunreinigt wurde, welche ihn auf den Sand des Käfigs verstreuten. In allen übrigen Fällen wurde den Versuchstieren trockener Hafer gegeben.

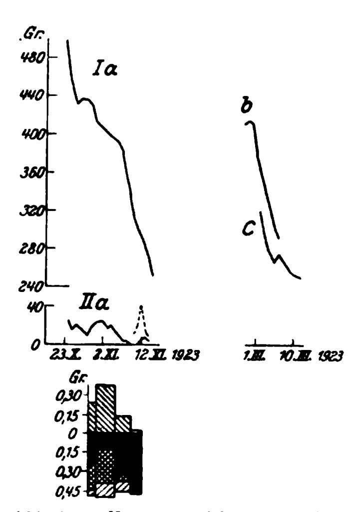


Abb. 1. *a* Kurven, welche sich auf das Meerschweinchen Nr. 2 beziehen. I. das Gewicht des Tieres in Grammen. II. die eingenommene Nahrung in Grammen. Mit der ununterbrochenen Linie ist der Hafer, mit der punktierten Linie der Kohl bezeichnet. III. Stickstoffwechsel. Stickstoff in hundertsten Teilen eines Gramms. *b* Gewicht des Meerschweinchens Nr. 9. *c* Gewicht des Meerschweinchens Nr. 10 (in Grammen).

Alle auf ausschließliche Hafernahrung gesetzte Meerschweinchen kamen in kurzer Zeit um. Im Anfang des Versuchs fraßen sie Hafer gern, aber dann fingen sie an, ihn zu verstreuen und verloren ihren Appetit. Gleichzeitig damit begann eine bedeutende Gewichtsabnahme. Diese Wirkung der einseitigen Ernährung mit Hafer ist deutlich aus den beiliegenden Kurven zu ersehen (Abb. 1). Die Meerschweinchen Nr. 9 und 10 bekamen während der ganzen Zeitdauer des Versuchs allein Hafer, das Meerschweinchen Nr. 2 erhielt erst ganz gegen Ende des Versuchs Kohl, als dasselbe bereits keine günstige Wirkung mehr hervorrufen konnte. Das Meerschweinchen Nr. 9 kam am 10., das Meerschweinchen Nr. 10 am 13., das Meerschweinchen Nr. 2 am 23. Tage des Versuchs um. Im Laufe dieser Zeit hatten das Meerschweinchen Nr. 9 29 Proz., das Meerschweinchen Nr. 10 22 Proz. und das Meerschweinchen Nr. 2 49 Proz. ihres Gewichts verloren. Die Gewichtsabnahme und der Verlust des Appetits wurde von einer Schlaffheit der Meerschweinchen begleitet. Bei dem Meerschweinchen Nr. 2 wurde eine Erkrankung der Augen und Parese der hinteren Extremitäten beobachtet.

Wenn wir nun zu den sieben folgenden Versuchen übergehen, in welchen den Meerschweinchen nach vorhergehender reiner Hafernahrung

in das Futter Kohl hinzugefügt wurde (das Meerschweinchen Nr. 7 bekam Kohl vom Anfang des Versuchs an), so kann man bemerken, daß anfangs, zur Zeit der ausschließlichen Fütterung mit Hafer, dieselben charakteristischen Kurven erhalten werden, welche auf den Verlust des Appetits für Hafer und auf die Gewichtsabnahme des Meerschweinchens hinweisen, allerdings mit einigen individuellen Abweichungen. In dieser Beziehung ist das Meerschweinchen Nr. 3 besonders interessant, welches nach einem Gewichtsverlust von 30 g ganz am Anfang des

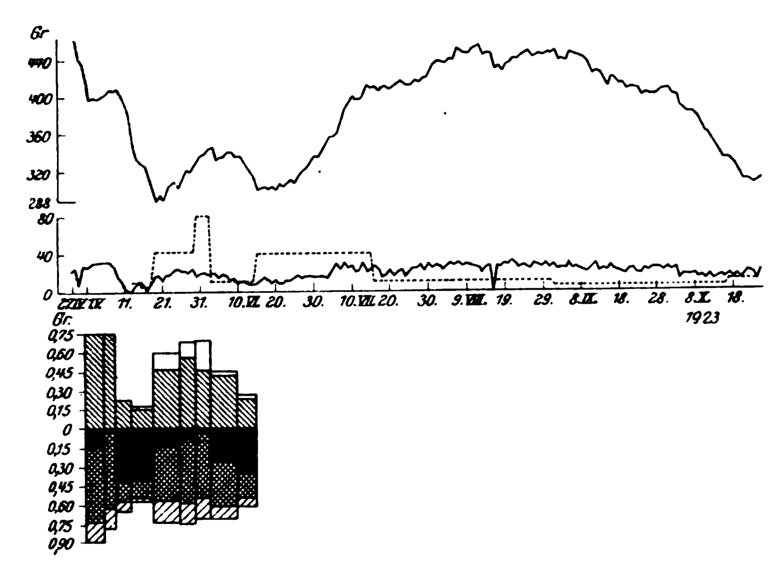


Abb. 2. Meerschweinchen Nr. 1. I. Gewicht des Tieres in Grammen. II. die eingenommene Nahrung in Grammen. Mit der ununterbrochenen Linie ist der Hafer, mit der punktierten der Kohl bezeichnet. III. Stickstoffwechsel. Der Stickstoff in hundertsten Teilen eines Gramms.

Versuchs, im Laufe von fast 3 Wochen sein Gewicht und seinen Appetit für Hafer unverändert beibehielt. Zum Unterschied von den Meerschweinchen, welche sich ausschließlich von Hafer nährten, ist die Lebensdauer derjenigen Meerschweinchen, welche Hafer mit einem Zusatz von Kohl erhielten, sehr bedeutend. So ging z. B. das Meerschweinchen Nr. 1 erst am 179. Tage des Versuchs, das Meerschweinchen Nr. 4 am 185. Tage ein; der Versuch mit dem Meerschweinchen Nr. 3 dauerte 187 Tage, mit dem Meerschweinchen Nr. 8 240 Tage, worauf beide auf gemischte Nahrung gesetzt wurden, welche aus Hafer, Heu und Gemüse bestand.

Die Gewichtsabnahme der Meerschweinchen, welche Kohl erhalten, wird zeitweilig angehalten, die Meerschweinchen nehmen an Gewicht zu, allein gegen Ende des Versuchs ist ihr Gewicht meist bedeutend

geringer als das Anfangsgewicht. So wird die Veränderung des Gewichts bei den oben bezeichneten Meerschweinchen durch folgende Ziffern ausgedrückt: das Meerschweinchen Nr. 1 verlor im Laufe der ganzen Zeit des Versuchs 33 Proz., das Meerschweinchen Nr. 4 hatte das Endgewicht auf 13 g höher als das Anfangsgewicht.

Kohl erhöht den Appetit der Meerschweinchen für Hafer, aber nicht immer in gleichem Grade, was von der Größe der Dosis und von der vorhergegangenen Nahrung abhängt. Große Dosen von Kohl (40, 60 und 80 g) rufen einen zweifellos günstigen Effekt hervor, wobei man die Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Zeit ihres Zusatzes bemerken kann. Der Zusatz großer Dosen zur Nahrung der Meerschweinchen Nr. 1, 3 und 4 am Anfang des Versuchs rief, wie aus den beiliegenden Kurven (Abb. 2, 3 und 4) zu ersehen ist, eine Erhöhung des Appetits für Hafer und eine Gewichtszunahme der Meerschweinchen hervor.

Der Zusatz jedoch auch von größeren Dosen Kohl rief nach langdauernder Nahrung mit reinem Hafer oder nach längerer Nahrung mit kleinen Dosen Kohl, welche von einer großen Gewichtsabnahme und Verschlechterung des Allgemeinbefindens des Tieres begleitet wurde, die gewöhnliche Wirkung nicht hervor. So übte der spätere Zusatz einer Dosis von 40 g auf das Meerschweinchen Nr. 2 keine Wirkung aus, dessen Zustand bis zum Zeitpunkt des Zusatzes von Kohl sich bereits so verschlimmert hatte, daß es auch den Appetit für Kohl verloren hatte.

Eine geringe Wirkung zeigten auch große Dosen am Ende des Versuchs mit dem Meerschweinchen Nr. 3 nach einer längeren Fütterung mit kleinen oder mittleren Dosen Kohl.

Eine Dosis von 20 g wurde am Anfang des Versuchs im Laufe von einigen Tagen den Meerschweinchen Nr. 1 und 3 gegeben, als Übergang von kleinen Dosen zu größeren, wodurch keine merkliche günstige Wirkung hervorgebracht wurde. Andauernd bekam solche Dosis nur das Meerschweinchen Nr. 3 (Abb. 3): das erste Mal im Laufe von 4 Wochen nach einer anhaltenden Fütterung des Meerschweinchens mit 40 g Kohl, das zweite Mal im Laufe von 25 Tagen am Ende des Versuchs nach den Perioden der Fütterung des Meerschweinchens mit 5 und 10 g Kohl, als das Tier schon an Gewicht verlor. Im ersten Falle fuhr der Appetit des Meerschweinchens für Hafer fort sich zu erhöhen, und dasselbe nahm an Gewicht zu. Im zweiten Falle des Zusatzes von 20 g Kohl hörte die Gewichtsabnahme des Meerschweinchens nicht auf, obgleich die Abnahme des Appetits einigermaßen angehalten wurde.

Auf diese Weise kann man auch bei einer Dosis von 20 g die Abhängigkeit ihrer Wirkung von der vorhergegangenen Nahrung feststellen.

Eine Dosis von 10 g Kohl wurde dem Meerschweinchen unter verschiedenen Bedingungen des Versuchs gegeben und rief in Abhängigkeit davon einen verschiedenen Effekt hervor. Wenn diese Dosis (10 g) nach einer längeren Fütterung mit großen Dosen Kohl gegeben wurde, so erwies sie einen unbedingt günstigen Einfluß: das Meerschweinchen Nr. 1 (Abb. 2) bekam sie im Verlauf von 6 Wochen nach einer andauernden Fütterung mit 40 g Kohl, das Meerschweinchen Nr. 3 (Abb. 3) im Verlauf von 4 Wochen nach längeren Perioden von Fütterung mit 40 und 20 g Kohl. Der Appetit beider Meerschweinchen für Hafer blieb

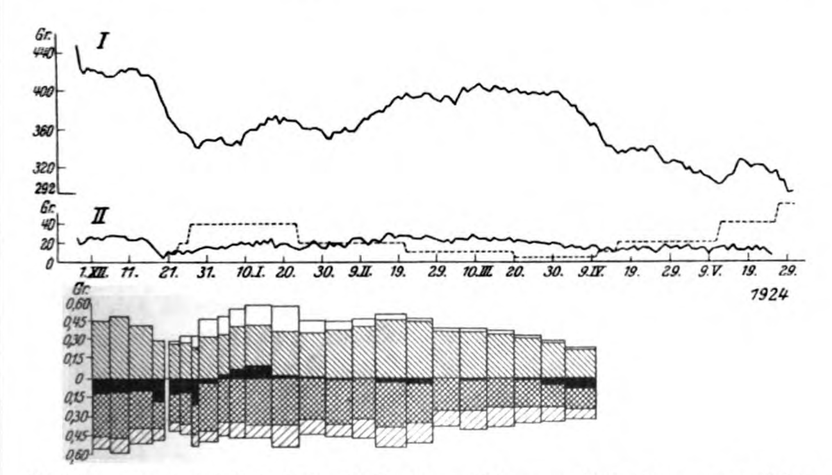


Abb. 3. Meerschweinchen Nr. 3. I. Gewicht des Tieres in Grammen. II. die eingenommene Nahrung in Grammen. Mit der ununterbrochenen Linie wird der Hafer, mit der punktierten der Kohl bezeichnet. III. Stickstoffwechsel. Der Stickstoff in hundertsten Teilen eines Gramms.

ein guter und sie nahmen an Gewicht zu. Hierbei ist zu bemerken, daß der Zusatz dieser Dosis beim Meerschweinchen Nr. 1 mit dem Übergang zum Sommerkohl zusammenfiel, welcher eine größere Wirkung hervorruft als der Kohl, welcher lange Zeit aufbewahrt worden ist.

Die nach einer kurze Zeit dauernden Fütterung mit großen Dosen oder nach einer Dose von 5 g und einer vorhergegangenen ausschließlichen Ernährung mit Hafer hinzugefügte Dose von 10 g zeigte eine verschiedene Wirkung, je nach der Dauer der Fütterung ausschließlich mit Hafer am Anfang des Versuchs.

So war bei dem Meerschweinchen Nr. 1 (Abb. 2), welches am 17. Tage des Versuchs Kohl bekam, die Dose von 10 g ungenügend, als sie nach einer kurzen vorhergegangenen Fütterung mit großen Dosen gegeben wurde.

Bei dem Meerschweinchen Nr. 4 (Abb. 4), dessen ausschließliche Haferernährung nur 7 Tage gedauert hatte, zeigte die Dose von 10 g,

welche im Laufe von 128 Tagen nach einer kurze Zeit dauernden Fütterung mit großen Dosen gegeben wurde, eine günstige Wirkung und rief eine Steigerung des Appetits und Gewichtszunahme des Meer-

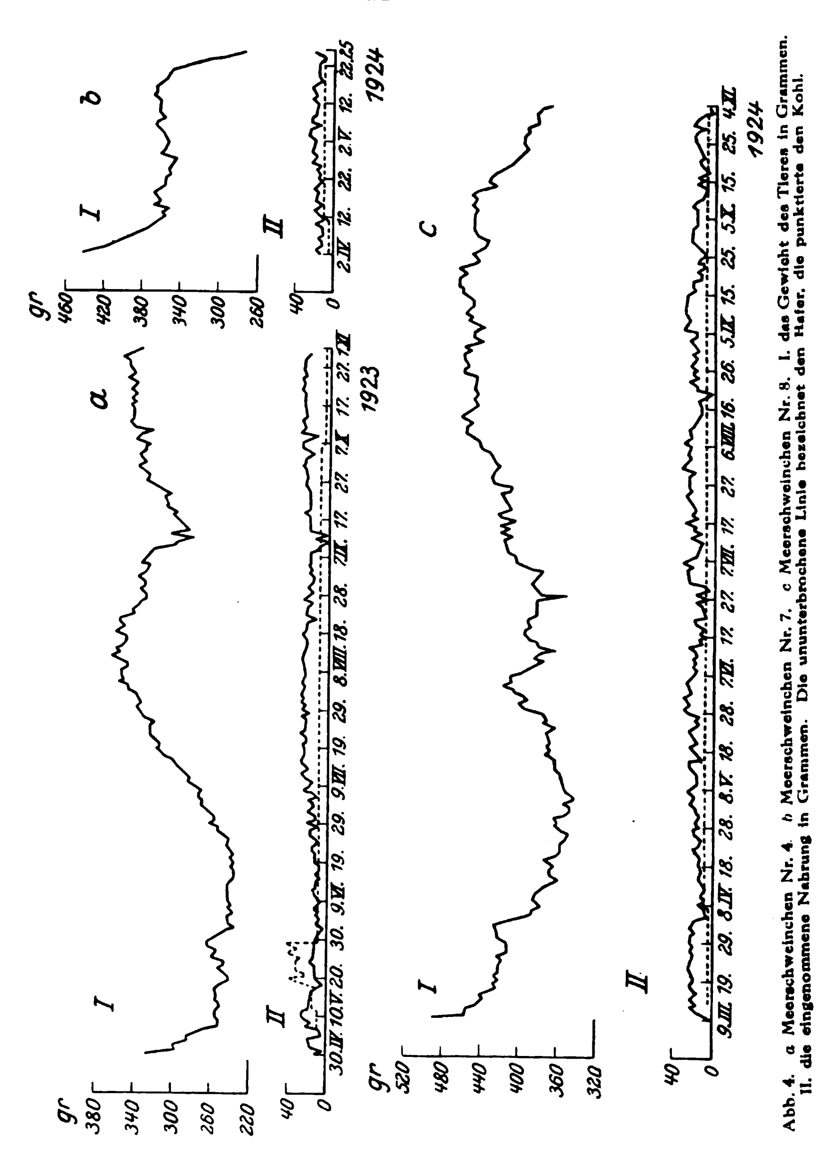


Abb. 4. a Meerschweinchen Nr. 4. b Meerschweinchen Nr. 7. c Meerschweinchen Nr. 8. I. das Gewicht des Tieres in Grammen. II. die eingenommene Nahrung in Grammen. Die ununterbrochene Linie bezeichnet den Hafer, die punktierte den Kohl.

schweinchens hervor. Doch auch hier muß erwähnt werden, daß di starke Gewichtszunahme mit dem Übergang zum Sommerkohl zu sammenfiel. Der dauernde Effekt der Dose von 10 g wurde im Septembe

durch eine zufällige Erkältungskrankheit gestört, welche eine zeitweilige Abnahme des Gewichts veranlaßte.

Das Meerschweinchen Nr. 5 (Abb. 5) bekam Kohl nach einer vorhergegangenen langen Ernährung mit Hafer, welche 17 Tage gedauert hatte. Es erhielt fast 4 Wochen lang einen Zusatz von 5 g Kohl, worauf die Dose auf 10 g erhöht wurde. Allein die unter solchen Umständen zugesetzte Dose von 10 g ergab keine Resultate.

Ähnlich dem Meerschweinchen Nr. 5 bekam auch das Meerschweinchen Nr. 8 (Abb. 4) eine Dose von 10 g Kohl nach einer fast vierwöchigen Fütterung mit einer Dose von 5 g. Allein wahrscheinlich dank dem Umstande, daß die ausschließliche Hafierernährung nur 4 Tage gedauert hatte, zeigte diesmal die Dose von 10 g eine ungewöhnlich langdauernde Wirkung: das Meerschweinchen erhielt diese Dose im Laufe von 7 Monaten, der Haferverbrauch und das Gewicht des Meerschweinchens hielten sich, abgesehen von einigen Schwankungen, auf einer bedeutenden Höhe. Allerdings gesellte sich dazu auch bei diesem Versuch im Juni der Einfluß des Sommerkohls. Gegen Ende des Versuchs begann das Meerschweinchen an Gewicht zu verlieren, sein Zustand verschlechterte sich und es wurde auf gemischte Nahrung übergeführt.

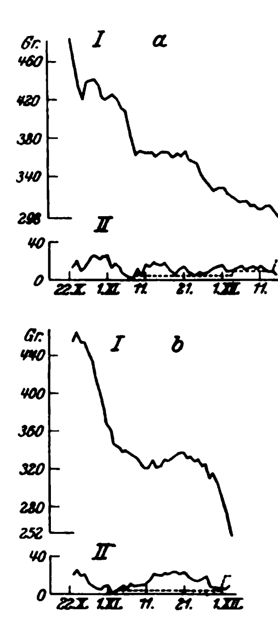


Abb. 5. *a* Meerschweinchen Nr. 5. *b* Meerschweinchen Nr. 6. I. das Gewicht des Tieres in Grammen. II. die eingenommene Nahrung in Grammen. Die ununterbrochene Linie bezeichnet den Hafer, die punktierte den Kohl.

Endlich das Meerschweinchen Nr. 7 (Abb. 4), bekam nach einem neuntägigen Zusatz (gleich vom Anfang des Versuchs) von 5 g Kohl eine Dose von 10 g im Laufe von 44 Tagen. Im Laufe von 36 Tagen bewahrte das Meerschweinchen seinen guten Appetit für Hafer, und sein Gewicht schwankte nur in geringen Grenzen. Darauf trat eine plötzliche Gewichtsabnahme ein, welche mit dem Tode des Tierchens endete. Gegen Ende des Versuchs tränten beim Meerschweinchen Nr. 7, ebenso wie beim Meerschweinchen Nr. 2 die Augen, und es wurde Parese der Hinterfüße beobachtet.

Auf Grund alles Obenerwähnten kann man den Schluß ziehen, daß die Dose von 10 g Kohl nur bei bestimmten Bedingungen des Versuchs eine günstige Wirkung aufweist, nämlich, wenn das Meerschweinchen noch nicht allzusehr durch die einseitige Hafierernährung

geschwächt oder sein Zustand durch dauernden Zusatz von großen Dosen Kohl verbessert worden ist.

Der günstige Einfluß der Dose von 5 g ist ein ziemlich geringer, unabhängig von der Zeit des Zusatzes. Diese Dose (5 g) wurde unter verschiedenen Bedingungen des Versuchs den Meerschweinchen Nr. 1 (Abb. 2), Nr. 3 (Abb. 3) und Nr. 4 (Abb. 4) gegen Ende desselben nach vorangegangener Fütterung mit 10 g Kohl, den Meerschweinchen Nr. 5, 6 (Abb. 5) und Nr. 8 (Abb. 4) zu verschiedener Zeit nach Beginn des Versuchs nach einer ausschließlichen Haferernährung, dem Meerschweinchen Nr. 7 (Abb. 4) sogleich vom Beginn des Versuchs an gegeben. In diesen Fällen hielt die Dose von 5 g Kohl die Gewichtsabnahme des Meerschweinchens eine Zeitlang auf, ohne indessen eine Zunahme hervorzurufen, und unterstützte, zuweilen erhöhte sogar den Appetit für Hafer. Nach einiger Zeit begann die Wirkung nachzulassen, die Meerschweinchen verloren an Gewicht und den Appetit für Hafer. Besonders lange andauernd war ihre Wirkung bei dem Versuch mit dem Meerschweinchen Nr. 1 (Abb. 2), welches 5 g im Laufe von 6 Wochen bekam. Eine gewisse Ausnahme stellt das Meerschweinchen Nr. 4 (Abb. 4) dar, welches 5 g Kohl während der letzten 25 Tage des Versuchs erhielt und dabei etwas an Gewicht zugenommen hatte. Während dieser ganzen Zeit bewahrte es einen guten Appetit für Hafer. Der Tod trat ganz unerwartet bei einer Gewichtsabnahme von 20 g ein, und die Sektion ergab keine besonderen anatomisch-pathologischen Veränderungen.

Im allgemeinen kann man sagen, daß der Zusatz von kleinen Dosen (5 bis 10 g) Winterkohl allein (Meerschweinchen Nr. 5, 6 und 7) die Gewichtsabnahme lange Zeit nicht aufhalten und den Tod nicht abwenden kann. Der Versuch mit dem Meerschweinchen Nr. 5 dauerte 55 Tage, der Versuch mit dem Meerschweinchen Nr. 6 43 Tage und mit dem Meerschweinchen Nr. 7 54 Tage. Alle Meerschweinchen kamen um, nachdem sie einen bedeutenden Teil ihres Gewichts verloren hatten. So hatte das Meerschweinchen Nr. 5 39 Proz., das Meerschweinchen Nr. 6 44 Proz. und das Meerschweinchen Nr. 7 37 Proz. verloren. Die Erhöhung der Dose Kohl in den letzten Tagen des Versuchs mit den Meerschweinchen Nr. 5 und 6 bis 20 g konnte ihren Untergang nicht mehr aufhalten. Der Sommerkohl ist ein stärkeres Gegenmittel gegen Skorbut, und infolgedessen haben auch dessen kleinere Dosen eine stärkere Wirkung. So wurde der dauernde Effekt dieser Dosen bei dem Meerschweinchen Nr. 8, welches sie im Verlauf des ganzen Versuchs, und bei dem Meerschweinchen Nr. 4, welches sie auch im Verlauf des ganzen Versuchs, abgesehen von einem kurze Zeit dauernden Zusatz einer großen Dose ganz am Anfang erhielt, durch die Fütterung der Meerschweinchen vom 20. Juni an mit Sommerkohl hervorgerufen.

Auf die Weise bestätigen unsere Versuche, daß der Kohl beim Aufbewahren einen Teil seiner antiskorbutischen Eigenschaften verliert, worauf schon mehrmals in der Literatur im Zusammenhang mit der Labilität des Vitamins C aufmerksam gemacht worden ist.

Wir können also feststellen, daß verschiedene Dosen Kohl eine verschiedene Wirkung haben, und zwar nicht nur in Abhängigkeit von ihrer Größe, sondern auch von der vorhergehenden Ernährung und ihrer Dauer. Augenscheinlich fehlen in der für den Organismus ungenügenden Nahrung gewisse ihm notwendige Stoffe, und daher ruft die längere Fütterung damit im Organismus solch ernstliche Störungen hervor, daß man seinen Zustand nur durch eine langdauernde Fütterung mit großen Dosen einer ergänzenden Nahrung verbessern kann. Eine kurze Zeit dauernde Entziehung dieser Stoffe ruft leichtere Störungen hervor, welche auch durch kleinere Dosen einer Ergänzungsnahrung beseitigt werden können.

Zum Zwecke eines genaueren Studiums des Einflusses der verschiedenen Dosen Kohl haben wir bei drei Meerschweinchen den Stickstoffwechsel untersucht.

Die Methodik der Versuche.

Das zum Versuch ausgewählte Meerschweinchen wurde in einen besonderen Käfig gesetzt. Im Laufe von einigen Tagen fuhren wir fort, ihm die gewohnte gemischte Nahrung zu verabreichen und beobachteten sein Gewicht. Wenn das Gewicht nicht abnahm, so wurde es auf Haferernährung übergeführt. Die ersten 4 bis 5 Tage der Haferernährung hatten den Zweck, den Einfluß der vorhergegangenen Nahrung zu beseitigen. Darauf wurde das Meerschweinchen in einen speziellen Käfig übergeführt, welcher für die Aufnahme von Harn und Kot hergerichtet war. In dem unteren Teile dieses Käfigs befanden sich zwei Metallnetze: das obere, auf welchem sich das Meerschweinchen aufhielt, hatte breite Maschen; durch dieses Netz konnte der Kot unbehindert auf das untere engmaschige Netz fallen. Der Harn floß durch das zweite Netz auf den Bleiboden des Käfigs, wohin ½ proz. Schwefelsäure ausgegossen wurde. Das zweite Netz war sehr schräg ausgespannt, weshalb der Kot, welcher auf dasselbe fiel, sich auf einer Seite ansammelte. In dem oberen Teile des Käfigs war eine Zwischenwand angebracht, welches dem Meerschweinchen nicht gestattete, sich über dem Teile des unteren Netzes aufzuhalten, wo sich der Kot ansammelte. Dadurch wurde auch nach Möglichkeit die Befeuchtung des Kotes mit Harn vermieden. Die Nahrung wurde dem Tiere zu einer bestimmten Tageszeit verabfolgt. Gleichzeitig wurde der Harn und der Kot gesammelt. Die Netze und der Boden wurden sorgfältig mit Wasser gewaschen und der Harn vereinigte sich mit dem Spülwasser. Der Kot wurde mit einer schwachen Schwefelsäure befeuchtet, getrocknet und in einer Kaffeemühle gemahlen. Das so erhaltene Pulver wurde in lufttrockenen Zustand gebracht.

Der ganze Versuch war in Perioden von 3 bis 7 und nur in vereinzelten Fällen von 2 und 8 Tagen Dauer eingeteilt. Der Harn und der Kot wurden täglich gesammelt, ihre Analyse aber (nach *Kjeldahl*) für eine ganze Periode des Versuchs nur einmal gemacht.

Die Nahrung der Meerschweinchen bestand aus Hafer ad libitum mit einem Zusatz, während einiger Perioden des Versuchs, von verschiedenen Dosen Kohl. Hafer und Kohl wurden auf ihren Gehalt an Stickstoff, Wasser und Asche hin analysiert (Hafer auch auf Fett hin), wobei sowohl zur Analyse, als auch zur Fütterung nur die dünnen Teile der Kohlblätter genommen wurden, nachdem sie von den gröberen Fasern befreit worden waren. Die Menge der eingenommenen Nahrung wurde genau berechnet.

Das Meerschweinchen Nr. 1. Der Versuch mit dem Meerschweinchen Nr. 1 (Abb. 2) dauerte 179 Tage (vom 27. April bis 26. Oktober 1923). Die Untersuchung des Stickstoffwechsels begann am fünften Tage des Versuchs und dauerte 45 Tage. Dieser Teil des Versuchs war in neun Perioden eingeteilt.

Das Protokoll des Versuchs. Das von gemischter Nahrung auf vorläufige Haferernährung übergeführte Meerschweinchen verlor im Verlaufe von 4 Tagen 69 g an Gewicht. Allein in den folgenden 8 Tagen begann es an Gewicht zuzunehmen. Das Meerschweinchen verzehrte in dieser Zeit durchschnittlich 30 g Hafer täglich. Die Größe der negativen Bilanz des Stickstoffs, welche in der ersten Periode (vom 1. bis 5. Mai) — 0,1443 g erreicht hatte, wurde in der folgenden Periode (vom 6. bis 8. Mai) niedriger — (0,0407 g). In der nächsten Periode (vom 9. bis 12. Mai) trat eine bedeutende Verschlechterung des Zustandes des Meerschweinchens ein: es begann eine starke Appetitabnahme und gleichzeitig mit ihr eine Verringerung des Gewichts. In dieser Periode verlor das Meerschweinchen 43 g und verzehrte täglich durchschnittlich nur 8 g Hafer, wobei es sich zur Speise nur die Mitte der Körner auswählte. Der Kot nahm eine unregelmäßige Form und eine dunklere Farbe an und enthielt viel Schleim. Die Stickstoffbilanz wurde mit einem Male negativ. In der folgenden Periode (vom 13. bis 15. Mai) fuhren die genannten Erscheinungen fort, sich in derselben Richtung zu entwickeln. Vom 13. bis 15. Mai wurde dem Meerschweinchen Kohl gegeben, jedoch es fraß ihn ungern und verzehrte durchschnittlich täglich nur 8 g. Gegen Ende dieser Periode verschlechterte sich das Allgemeinbefinden des Meerschweinchens noch mehr: es bewegte sich nur mit Mühe im Käfig, saß meistenteils, die Schnauze in den Futternapf gesenkt und verlor vom 13. bis 19. Mai noch 50 g. Angefangen vom 19. Mai veränderte sich der Zustand des Meerschweinchens sehr stark, es fing an gern Kohl zu fressen und verzehrte alle erhaltenen 40 g. Der Appetit für Hafer stieg, es verzehrte ungefähr 20 g Hafer täglich, wobei es aufhörte ihn auszuschälen. Das Gewicht nahm zu, der Kot bekam wieder seine normale Form. Die Größe der negativen Bilanz des Stickstoffs nahm ab (in der Periode vom 19. bis 25. Mai — 0,1531 g, in der Periode vom 26. bis 29. Mai — 0,0771 g). Jedoch in diesen beiden Perioden blieb das Meerschweinchen wie vorher schlaff und wenig beweglich. In der folgenden Periode vom 30. Mai bis 2. Juni wurde ihm Kohl in einer Menge von 80 g gegeben. Der Verbrauch des Hafers seitens des Meerschweinchens hörte auf zu steigen, aber das Meerschweinchen fuhr fort an Gewicht zuzunehmen und die Größe der negativen Stickstoffbilanz wurde noch geringer. In den nächsten zwei Perioden (vom 3. bis 9. Juni und vom 10. bis 16. Juni) erhielt das Meerschweinchen wieder nur 10 g Kohl. Sogleich erfolgte ein allmähliches Sinken des Appetits. Das Meerschweinchen fing wieder an den Hafer auszuschälen, der Kot bekam wieder eine unregelmäßige Form. Im Verlaufe der ersten von den genannten Perioden stieg das Gewicht des Meerschweinchens nach einer geringen Abnahme ein wenig, in der folgenden Periode jedoch begann eine starke Gewichts-

verringerung, welche erst dann aufhörte, als dem Tierchen täglich 40 g Kohl gegeben wurde. Die Stickstoffbilanz in beiden Perioden war eine stark negative.

Wir wollen nicht den weiteren Verlauf des Versuchs genau beschreiben, welcher nicht von einer Untersuchung des Stickstoffwechsels begleitet war, da ja dessen Resultate oben zugleich mit den Ergebnissen der anderen Versuche angeführt sind, welche den Zweck hatten, den Einfluß des Zusatzes verschiedener Dosen Kohl zum Hafer zu untersuchen. Wir wollen nur erwähnen, daß das Meerschweinchen im Verlaufe langer Perioden 40, 10 und endlich 5 g Kohl erhielt. Bei der letzten Dosis begann das Gewicht des Meerschweinchens zu fallen, anfangs allmählich, dann aber recht stark. Die Verdopplung der Dosis Kohl ergab keine Resultate. Das Meerschweinchen wurde schwach, schloß oft die Augen und atmete zuweilen schwer. Am 26. Oktober trat exitus letalis ein. Die Sektion ergab keine bedeutenden pathologisch-anatomischen Veränderungen.

Der Stickstoffwechsel des Meerschweinchens Nr. 1: Die Resultate der Untersuchung des Stickstoffwechsels sind in der Tabelle I angeführt. Wie man aus dieser Tabelle ersieht, hat die Stickstoffbilanz überall eine negative Größe, welche besonders niedrig in der zweiten Periode ist, bei ausschließlicher Haferernährung, die jedoch in dieser Zeit eine unbedeutende Gewichtszunahme hervorrief, und in der vierten und siebenten Periode, als das Meerschweinchen als Zusatz zum Hafer 40 g und 80 g Kohl bekam. In denjenigen Perioden, wo das Meerschweinchen an Gewicht abnahm, hat die Stickstoffbilanz eine stark negative Größe, unabhängig von dem Zusatz in einer dieser Perioden kleiner Dosen Kohl (Perioden 3, 4, 8 und 9).

In der letzten Rubrik der Tabelle ist der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung in den einzelnen Perioden des Versuchs angeführt. Wenn man die Perioden mit ungefähr gleicher mit der Nahrung eingeführter Menge von Stickstoff untereinander vergleicht, was zum Zwecke der Beseitigung des Einflusses des endogenen Stickstoffs gemacht worden ist (der Prozentsatz des letzteren schwankt im Kot in Abhängigkeit von der Menge des Nahrungsstickstoffs), so können wir die erste und zweite Periode, wo täglich 0,7422 und 0,7400 g Stickstoff eingeführt wurden, und die sechste und siebente Periode, wo 0,6699 und 0,6789 g Stickstoff eingeführt wurden, ins Auge fassen.

Die ersten zwei Perioden beziehen sich auf die ausschließliche Ernährung mit Hafer, als das Meerschweinchen durchschnittlich 30 g Hafer täglich verzehrte. Der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs in diesen Perioden beträgt 19,29 und 20,01 Proz. In den nächsten zwei Perioden verzehrte das Meerschweinchen durchschnittlich 20 g Hafer mit einer Beimischung von 40 g Kohl in der sechsten Periode und 80 g in der siebenten Periode.

In diesen Perioden war der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs etwas höher, und zwar 23,46 und 23,08 Proz. Die dritte

Tabelle I.

Nr.	Die Zeitperioden	Die Menge des täglich durchschnittlich verzehrten Hafers	Die Menge des täglich durchschnittlich verzehrten Kohls	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Hafer eingenommen	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Kohl eingenommen	Es wurde täglich durchschnittlich im Ganzen Stickstoff eingenommen	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Harn ausgeschieden	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Kot ausgeschieden	Es wurde täglich durchschnittlich im Ganzen Stickstoff ausgeschieden	Stickstoffbilanz	Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung
		g	g	g	g	g	g	g	g		Proz.
1	1. bis 5. V.	30	—	0,7422	—	0,7422	0,7433	0,1432	0,8865	— 0,1443	19,29
2	6. „ 8. V.	30	—	0,7400	—	0,7400	0,6326	0,1481	0,7807	— 0,0407	20,01
3	9. „ 12. V.	8	—	0,2192	—	0,2192	0,5796	0,0719	0,6515	— 0,4323	32,82
4	13. „ 18. V.	6	8	0,1462	0,0235	0,1697	0,5530	0,0308	0,5838	— 0,4141	18,15
5	19. „ 25. V.	18	43	0,4616	0,1217	0,5833	0,5707	0,1657	0,7364	— 0,1531	28,42
6	26. „ 29. V.	22	42	0,5497	0,1202	0,6699	0,5899	0,1571	0,7470	— 0,0771	23,46
7	30. V. bis 2. VI.	18	81	0,4504	0,2294	0,6798	0,5552	0,1569	0,7121	— 0,0323	23,08
8	3. bis 9. VI.	16	10	0,4074	0,0293	0,4367	0,6177	0,0890	0,7067	— 0,2700	20,39
9	10. „ 14. VI.	9	10	0,2319	0,0294	0,2613	0,5474	0,0707	0,6181	— 0,3568	27,07

Tabelle II.

Nr.	Die Zeitperioden	Die Menge des täglich durchschnittlich verzehrten Hafers	Die Menge des täglich durchschnittlich verzehrten Kohls	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Hafer eingenommen	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Kohl eingenommen	Es wurde täglich durchschnittlich im Ganzen Stickstoff eingenommen	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Harn ausgeschieden	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Kot ausgeschieden	Es wurde täglich durchschnittl ch im Ganzen Stickstoff ausgeschieden	Stickstoffbilanz	Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung
		g	g	g	g	g	g	g	g		Proz.
1	29. bis 30. X.	13	—	0,2302	—	0,2302	0,4439	0,0506	0,4945	— 0,2643	22,0
2	31. X. bis 4. XI.	21	—	0,3671	—	0,3671	0,3867	0,1102	0,4969	— 0,1208	30,03
3	5. bis 8. XI.	7,5	—	0,1303	—	0,1303	0,3822	0,0822	0,4644	— 0,3341	63,08
4	9. „ 11. XI.	—	9	—	0,0220	0,0220	0,4636	0,0175	0,4811	— 0,4591	79,55

und vierte Periode stehen auch, was die Menge des mit der Nahrung eingeführten Stickstoffs betrifft, einander ziemlich nahe — 0,2192 und 0,2613 g N täglich. In diesen beiden Perioden fraß das Meerschweinchen Hafer sehr ungern und verlor an Gewicht. In der neunten Periode bekam es außer Hafer 10 g Kohl. Der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung betrug in der dritten Periode 32,82 Proz., in der neunten Periode 27,07 Proz. Man kann voraussetzen, daß der Zusatz von Kohl unter gleichen Bedingungen des Versuchs die Aneignung des Stickstoffs der Nahrung einigermaßen verbessert. Wenn man die Ziffern betrachtet, welche den Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung im Verlauf des Versuchs ausdrücken, so kann man bemerken, daß bei einseitiger Ernährung mit Hafer die Aneignung des Stickstoffs der Nahrung fällt (erste, zweite und dritte Periode). Der Zusatz zum Hafer, 10, 40 und 80 g Kohl (vierte, sechste, siebente und achte Periode), erhöht die Aneignung des Stickstoffs der Nahrung und nähert dieselbe der Aneignung der Anfangsperiode, als die ausschließliche Haferernährung noch keinen bemerkbaren schädlichen Einfluß auf den Organismus des Meerschweinchens ausgeübt hatte.

Die in der fünften Periode unerwartet hohe Ziffer des Prozentsatzes der Nichtaneignung des Stickstoffs, 28,42, steht vielleicht damit im Zusammenhang, daß das Meerschweinchen in der vorhergegangenen Periode sehr wenig Nahrung zu sich genommen hatte, in der fünften Periode dagegen der Appetit sich stark erhöhte. In der letzten Periode erwies sich die Dosis von 10 g Kohl schon als ungenügend: der Zustand des Meerschweinchens begann sich zu verschlechtern, und damit hängt wahrscheinlich der hohe Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs in dieser Periode zusammen.

Das Meerschweinchen Nr. 2. Der Versuch mit dem Meerschweinchen Nr. 2 (Abb. 1) erstreckte sich vom 23. Oktober bis zum 15. November 1923. Die Untersuchung des Stickstoffwechsels begann am 29. Oktober und dauerte 14 Tage lang, welche in vier Perioden eingeteilt wurden.

Das Protokoll des Versuchs. Die vorhergehende Haferernährung hatte eine Appetitabnahme und ein rapides Fallen des Gewichts hervorgerufen, welches letztere dann ein wenig zum Stillstand kam. Die erste Periode der Untersuchung des Stickstoffwechsels vom 29. bis 30. Oktober fiel mit dem Beginn der Appetitzunahme zu Hafer und gleichzeitiger Gewichtsabnahme zusammen. Die Stickstoffbilanz erreichte in dieser Zeit —0,2643 g. In der zweiten Periode vom 31. Oktober bis 4. November fraß das Meerschweinchen Hafer ziemlich gern, nahm aber immer noch an Gewicht ab. Die negative Größe der Stickstoffbilanz wurde niedriger. In der folgenden Periode vom 5. bis 8. November trat eine Appetitsabnahme ein und eine noch größere Gewichts-

abnahme. Das Meerschweinchen fing an den Hafer auszuschälen, der Kot nahm eine unregelmäßige Form an. Die Stickstoffbilanz wurde stark negativ. In der letzten Periode vom 9. bis 11. November hörte das Meerschweinchen ganz auf Hafer zu fressen und nahm immer mehr an Gewicht ab. Die Stickstoffbilanz erreichte in dieser Periode —0,4591 g. In dieser Periode wurde dem Tierchen Kohl gegeben, welchen es ungern und in kleinen Mengen fraß. Wie bereits erwähnt, kam das Meerschweinchen Nr. 2 am 24. Tage des Versuchs um, wobei vor dem Tode eine Erkrankung der Augen und Parese der Hinterfüße beobachtet wurde. Bei der Sektion wurde eine äußerste Abmagerung gefunden, die Gekrösegefäße waren erweitert, die Gedärme stellenweise von Gasen gedunsen. Im Magen fanden sich kleine Blutungen und eine kleine Kugel aus Haaren von der Größe einer kleinen Erbse. Die Zähne wackelten nicht.

Die Tabelle II zeigt die Größe der negativen Bilanz des Stickstoffs, welche besonders gegen Ende des Versuchs anwuchs. In diesem Versuch haben wir zum Vergleich des Prozentsatzes der Nichtaneignung des Stickstoffs keine Perioden mit annähernd gleicher Menge Stickstoff der Nahrung. Wir bemerken nur, daß die Aufnahme von Stickstoff sich mit jeder Periode verschlechterte mit gleichzeitiger Verschlechterung des Zustandes des Meerschweinchens.

Es ist nötig sich zu merken, daß man diese zwei Versuche als vorläufige ansehen muß, da die Untersuchung des Stickstoffwechsels in denjenigen Perioden, wo die Meerschweinchen den Hafer ausschälten (3., 4., 8. und 9. Periode beim ersten Meerschweinchen und die 3. Periode bei dem zweiten Meerschweinchen), keinen Anspruch auf genügende Genauigkeit machen kann. Die Sache liegt nämlich daran, daß wir nicht den Stickstoffgehalt des von den Meerschweinchen übriggelassenen Hafers bestimmten, da dieselben in diesen Perioden hauptsächlich die Mitte der Körner fraßen, welche, wie bekannt, einen anderen Stickstoffgehalt hat, als die Schale. In dem folgenden Versuche haben wir diesem Mangel abgeholfen und in diesen Perioden die Analyse auch des nachgelassenen Hafers ausgeführt. Diese Analyse zeigte, daß die Verbesserung, welche man in dem ersten und zweiten Versuch hätte machen müssen, die Resultate nicht wesentlich verändert haben würde.

Das Meerschweinchen Nr. 3. Der Versuch mit dem Meerschweinchen Nr. 3 (Abb. 3) dauerte 187 Tage, vom 27. November 1923 bis zum 1. Juni 1924. Die Untersuchung des Stickstoffwechsels erstreckte sich über 130 Tage und war in 23 Perioden eingeteilt. Dieses Meerschweinchen unterschied sich von seinen Vorgängern durch eine weit größere Resistenz gegen den schädlichen Einfluß der ausschließlichen Haferernährung.

Das Protokoll des Versuchs. Im Laufe der vorangegangenen Ernährung mit Hafer verlor das Meerschweinchen nur 30 g. Im Verlaufe der ersten drei Perioden der Untersuchung des Stickstoffwechsels (vom 1. bis 16. Dezember) fraß das Meerschweinchen gern Hafer und verzehrte täglich durch-

schnittlich 25 g. Sein Gewicht hielt sich auf unveränderter Höhe. Die Stickstoffbilanz hatte die ganze Zeit über fast ein und dieselbe negative Größe (— 0,1158 bis — 0,1002).

Am Ende der dritten Periode begann der Appetit für Hafer zu sinken, was sich besonders in der folgenden Periode (vom 17. bis 19. Dezember) ausprägte. In dieser Periode zeigten sich alle übrigen Erscheinungen, welche gewöhnlich die Zustandsverschlechterung des Meerschweinchens begleiten: es schälte den Hafer aus und warf ihn umher, sein Gewicht nahm ab, der Kot bekam eine unregelmäßige Form und enthielt viel Schleim. Die Größe der negativen Stickstoffbilanz stieg bis zu — 0,1857 g. In den folgenden drei Perioden erhielt das Meerschweinchen Hafer mit einem Zusatz von Kohl, und zwar: in den Perioden vom 21. bis 23. Dezember 10 g; vom 24. bis 26. Dezember 20 g; vom 27. bis 28. Dezember 40 g. Der Appetit für Hafer hob sich unbedeutend, das Meerschweinchen verzehrte täglich durchschnittlich 10 g Hafer. Die Gewichtsabnahme setzte sich fort. Die Stickstoffbilanz zeigte anfangs eine niedrigere negative Größe, aber in der dritten von den genannten Perioden erreichte sie plötzlich — 0,2027 g. Wir blieben auf der Dosis von 40 g Kohl stehen und verabreichten sie dem Meerschweinchen im Verlaufe von 4 Wochen. Zuerst fraß das Meerschweinchen den Kohl langsam und ungern, dann aber warf es sich auf ihn. Das Meerschweinchen fuhr fort den Hafer auszuschälen, aber verzehrte ihn in großer Menge. Sein Gewicht stieg vom 29. Dezember bis zum 23. Januar von 341 g auf 367 g. Die Stickstoffbilanz hatte zuerst eine negative, dann aber eine positive Größe. Die nächsten 4 Wochen vom 24. Januar bis 20. Februar bekam das Meerschweinchen nur 20 g Kohl. Die Quantität des verzehrten Hafers schwankte durchschnittlich um 22 g herum, wobei in den ersten 2 Wochen das Meerschweinchen den Hafer noch ausschälte und verstreute. Der Kot bekam allmählich seine regelmäßige Form. Die Stickstoffbilanz hatte bald eine unbedeutende negative, bald eine unbedeutende positive Größe und nur in der letzten Woche dieser Periode der Fütterung erhielt sie eine höhere negative Größe (— 0,0401 g). Die nächsten 4 Wochen vom 21. Februar bis zum 19. März bekam das Meerschweinchen 10 g Kohl. Es fuhr fort seinen guten Appetit für Hafer zu bewahren und verzehrte von ihm täglich durchschnittlich 24 g. Sein Gewicht blieb, abgesehen von unbedeutenden Schwankungen, fast unverändert. In der ersten Woche dieser Periode der Fütterung hatte die Stickstoffbilanz eine ziemlich bedeutende negative Größe (— 0,0522 g), jedoch weiterhin zeigte sie bald eine geringe negative, bald eine unbedeutende positive Größe Vom 20. März bis zum 9. April bekam das Meerschweinchen nur 5 g Kohl. Der Appetit für Kohl begann allmählich zu sinken. Vom 1. April begann auch die Gewichtsabnahme. Die Stickstoffbilanz bekam eine immer höhere negative Größe. Vom 10. April hörten wir mit der Untersuchung des Stickstoffwechsels auf.

Die darauf folgende Zunahme von Kohl in Dosen zuerst bis zu 10 g, dann bis zu 20 g verbesserten den Zustand des Meerschweinchens nicht. Die Erhöhung der Dosis bis zu 40 g ergab eine gewisse Zunahme des Gewichts, welches aber bald wieder sank. 60 g Kohl verhinderte nicht die weitere Abnahme des Gewichts. In dieser Periode konnten wir die Menge des verzehrten Hafers nicht feststellen, da der Hafer vom Meerschweinchen über den ganzen Käfig hin verstreut und in den Sand getreten und auch reichlich mit Harn befeuchtet wurde. Am 31. März wog das Meerschweinchen nur 293 g. Vom 1. Juni an wurde es auf gemischte Nahrung übergeführt und sein Gewicht begann sich zu erhöhen und erreichte am 19. Juni bereits 410 g.

Der Stickstoffwechsel des Meerschweinchens Nr. 3. Wenn wir die Summe der Resultate der Untersuchung des Stickstoffwechsels ziehen, welche in der Tabelle III angeführt sind, so bemerken wir folgendes:

1. Bei ausschließlicher Hafernährung hat das Meerschweinchen, selbst in den Perioden, wo es gern Hafer frißt und an Gewicht gar nicht oder nur wenig abnimmt, eine bedeutende negative Stickstoffbilanz.

2. In den Perioden mit verringertem Appetit für Hafer erreicht die negative Stickstoffbilanz eine sehr bedeutende Größe.

3. In den Perioden mit einem Zusatz von kleinen Dosen Kohl, welche eine kurze Zeit gegeben wurden, den Appetit für Hafer nicht verbesserten und auch die Gewichtsabnahme nicht aufhielten, hält sich die negative Bilanz auf gleicher Höhe.

4. Bei dem Zusatz von großen Dosen Kohl (40 g) hat die Stickstoffbilanz mit Ausnahme von zwei Perioden eine positive Größe. Eine negative Größe der Stickstoffbilanz zeigte sich in den ersten zwei Perioden mit einem Zusatz von 40 g Kohl. Wahrscheinlich wirkte hier noch der Einfluß der vorhergegangenen Hafernährung.

5. In den Perioden, wo lange Zeit hindurch zum Hafer kleine Dosen Kohl (10 und 20 g) hinzugefügt wurden, war die Stickstoffbilanz schwach negativ, mit Ausnahme von zwei Perioden, in denen sie eine unbedeutende positive Größe hatte.

6. Der Übergang zur Dosis von 5 g Kohl ruft eine Vergrößerung der negativen Bilanz hervor.

Zur Erklärung der Frage, wie sich die Aneignung des Stickstoffs der Nahrung während des Versuchs veränderte, haben wir in der Tabelle IV die Perioden des Versuchs so geordnet, daß die miteinander zu vergleichenden Perioden, d. h. diejenigen, welche nahestehende Ziffern des mit der Nahrung eingeführten Stickstoffs aufweisen, nebeneinander zu stehen kommen.

Bevor wir zur Erklärung dieser Tabelle übergehen, müssen wir noch bemerken, daß im Verlauf der siebenten und teilweise auch der achten Periode es sehr schwer war, den Harn und den Kot zu sammeln, da der Kot eine halbflüssige Konsistenz hatte: er fiel nicht immer auf das untere Netz, und wenn er auf dasselbe auch fiel, so rollte er nicht nach unten. Dieses konnte die Durchfeuchtung des Kotes mit Harn hervorrufen und somit die genaue Bestimmung der Stickstoffaneignung beeinflussen. Im Anfang der Tabelle sind zehn Perioden dargestellt, in welchen die Quantität des täglich eingeführten Stickstoffs von 0,413 bis 0,503 g schwankt.

Das sind die Perioden 1, 2, 3, 8, 9, 13, 14, 15, 16 und 17 (vgl. Tabelle IV).

Tabelle III.

Nr.	Die Zeitperioden	Die Menge des täglich durchschnittlich verzehrten Hafers	Die Menge des täglich durchschnittlich verzehrten Kohls	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Hafer eingenommen	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Kohl eingenommen	Es wurde täglich durchschnittlich im Ganzen Stickstoff eingenommen	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Harn ausgeschieden	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff i. Kot ausgeschieden	Es wurde täglich durchschnittlich im Ganzen Stickstoff ausgeschieden	Stickstoffbilanz	Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung
	1923	g	g	g	g	g	g	g	g		Proz.
1	1. bis 5. XII.	25	—	0,4400	—	0,4400	0,4537	0,1021	0,5558	—0,1158	23,20
2	6. „ 10. XII.	28	—	0,4835	—	0,4835	0,4652	0,1239	0,5891	—0,1056	25,62
3	11. „ 16. XII.	24	—	0,4130	—	0,4130	0,3939	0,1193	0,5132	—0,1002	28,89
4	17. „ 19. XII.	13	—	0,2950	—	0,2950	0,3903	0,0904	0,4807	—0,1857	30,65
5	21. „ 23. XII.	12	10	0,2735	0,0231	0,2966	0,3502	0,0644	0,4146	—0,1180	21,71
6	24. „ 26. XII.	11	20	0,2801	0,0462	0,3263	0,3617	0,0778	0,4395	—0,1132	23,83
7	27. „ 28. XII.	10	40	0,2397	0,0924	0,3321	0,4422	0,0926	0,5348	—0,2027	27,89
8	29. XII. bis 2. I.	15	40	0,3187	0,1402	0,4589	0,4159	0,0873	0,5032	—0,0443	19,03
	1924										
9	3. bis 5. I.	15	40	0,3355	0,1401	0,4756	0,3444	0,1042	0,4486	+ 0,0270	21,91
10	6. „ 9. I.	18	40	0,4061	0,1373	0,5434	0,3401	0,1324	0,4725	+ 0,0709	24,36
11	10. „ 16. I.	20	40	0,4059	0,1638	0,5697	0,3665	0,1063	0,4728	+ 0,0969	18,66
12	17. „ 23. I.	17	40	0,3602	0,2029	0,5631	0,3635	0,1746	0,5381	+ 0,0250	31,00
13	24. „ 30. I.	17	20	0,3469	0,1016	0,4485	0,3239	0,1161	0,4400	+ 0,0085	25,90
14	31. I. bis 6. II.	18	20	0,3739	0,0687	0,4426	0,3572	0,1005	0,4577	—0,0151	22,71
15	7. bis 12. II.	23	20	0,3977	0,0632	0,4609	0,3152	0,1505	0,4657	—0,0048	32,66
16	13. „ 20. II.	26	20	0,4495	0,0536	0,5031	0,3826	0,1605	0,5432	—0,0401	31,91
17	21. „ 27. II.	25	10	0,4362	0,0252	0,4614	0,3499	0,1637	0,5136	—0,0522	35,49
18	28. II. bis 5. III.	23	10	0,3620	0,0238	0,3858	0,2485	0,1343	0,3828	+ 0,0030	34,83
19	6. bis 12. III.	24	10	0,3598	0,0186	0,3784	0,2465	0,1504	0,3969	—0,0185	39,75
20	13. „ 19. III.	23	10	0,3374	0,0289	0,3663	0,2313	0,1476	0,3789	—0,0126	40,29
21	20. „ 26. III.	21	5	0,3109	0,0153	0,3262	0,2301	0,1200	0,3501	—0,0239	36,80
22	27. III. bis 1. IV.	18	5	0,2750	0,0153	0,2903	0,2267	0,1095	0,3362	—0,0459	37,71
23	2. bis 9. IV.	15	5	0,2199	0,0153	0,2352	0,2489	0,0729	0,3218	—0,0866	30,98

Bei der Durchsicht des Prozentsatzes der Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung in den oben genannten Perioden kann man folgendes bemerken:

1. Bei langdauernder Fütterung des Meerschweinchens mit Hafer allein vergrößerte sich der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung (1., 2. und 3. Periode).

Tabelle IV.

Nr. der Periode	Während der Zeitperioden	Die durchschnittlich täglich verzehrte Menge des Hafers g	Die durchschnittlich täglich verzehrte Menge des Kohls g	Es wurde täglich durchschnittlich Stickstoff eingenommen g	Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung Proz.	Stickstoffbilanz
1	1. bis 5. XII.	25	—	0,440	23,2	—0,12
2	6. „ 10. XII.	28	—	0,483	25,6	—0,11
3	11. „ 16. XII.	24	—	0,413	28,9	—0,10
8	29. XII. bis 2. I.	15	40	0,459	19,0	—0,04
9	3. bis 5. I.	15	40	0,476	21,9	+ 0,03
13	24. „ 30. I.	17	20	0,448	25,9	+ 0,008
14	31. I. bis 6. II.	18	20	0,443	22,7	—0,015
15	7. bis 12. II.	23	20	0,461	32,7	—0,005
16	13. „ 20. II.	26	20	0,503	31,9	—0,04
17	21. „ 27. II.	25	10	0,461	35,5	— 0,05
10	6. „ 9. I.	18	40	0,543	24,4	+ 0,07
11	10. „ 16. I.	20	40	0,570	18,7	+ 0,097
12	17. „ 23. I.	17	40	0,563	31,0	+ 0,02
18	28. II. bis 5. III.	23	10	0,386	34,8	+ 0,003
19	6. bis 12. III.	24	10	0,378	39,7	— 0,02
20	13. „ 19. III.	23	10	0,366	40,3	— 0,01
4	17. „ 19. XII.	13	—	0,295	30,6	—0,19
5	21. „ 23. XII.	12	10	0,297	21,7	—0,12
6	24. „ 26. XII.	11	20	0,326	23,8	—0,11
7	27. „ 28. XII.	10	40	0,332	27,9	—0,20
21	20. „ 26. III.	21	5	0,326	36,8	—0,02
22	27. III. bis 1. IV.	18	5	0,290	37,7	—0,05
23	2. bis 9. IV.	15	5	0,235	30,98	—0,09

2. Der Zusatz zum Hafer von 40 g Kohl erhöhte die Aneignung des Stickstoffs der Nahrung (8. und 9. Periode).

3. Bei langdauerndem Zusatz zum Hafer von 20 g Kohl verschlechterte sich die Stickstoffaneignung der Nahrung. Am Anfang dieser Periode der Fütterung stand die Stickstoffaneignung der Nahrung nahe derjenigen der ersten zwei Perioden mit ausschließlicher Haferernährung (13., 14., 15. und 16. Periode). Der Übergang zur Dosis von 10 g Kohl verursachte eine noch weitere Erhöhung des Prozentsatzes der Nichtaneignung von N der Nahrung (17. Periode). Die folgenden drei Perioden haben eine ungefähr gleiche Menge des Stickstoffs der Nahrung, und zwar die Perioden 10, 11 und 12, in denen seine Quantität zwischen 0,543 und 0,5697 g schwankt. In diesen

Perioden erhielt das Meerschweinchen 40 g Kohl. Der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs in diesen Perioden, mit Ausnahme der 12., ist kein hoher und steht ziemlich nahe den Größen, welche wir für diese Dosis Kohl schon bekommen haben (s. 8. und 9. Periode).

In den nächsten drei Perioden der Tabelle, und zwar der 18., 19. und 20. Periode, schwankt die Menge des täglich eingeführten Stickstoffs zwischen 0,366 und 0,386 g. Das sind alles Perioden mit dem Zusatz von 10 g Kohl.

Aus der Gegenüberstellung der erhaltenen Ziffern ergibt sich, daß bei dauernder Haferernährung mit einem Zusatz von 10 g Kohl die Stickstoffaneignung der Nahrung nachläßt.

Am Ende der Tabelle stehen noch sechs Perioden (4., 5., 6., 7., 21. und 22), in welchen die täglich mit der Nahrung eingeführte Quantität des Stickstoffs zwischen 0,290 und 0,332 g schwankt. In der 5. und 6. Periode verbesserte sich bei kurze Zeit andauerndem Zusatz zum Hafer einer kleinen Dosis Kohl (10 und 20 g) die Stickstoffaneignung im Vergleich der vorhergehenden Periode der reinen Haferernährung (Periode 4).

In der 7. Periode hat der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung bei einem Zusatz zum Hafer von 40 g Kohl eine bedeutende Größe — 27,9.

Vielleicht erklärt sich seine Größe dadurch, daß dem Meerschweinchen in dieser Periode zum erstenmal eine große Dosis Kohl verabreicht wurde.

In der 21. und 22. Periode bekam das Meerschweinchen 5 g Kohl, wobei sich sein Zustand verschlechterte; es verlor allmählich an Gewicht und seinen Appetit für Hafer. Der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung war ein sehr bedeutender. Ziemlich vereinzelt steht die 23. Periode des Versuchs da, wo die Quantität des täglich eingeführten Stickstoffs nur 0,235 g betrug. An Kohl wurden 5 g gegeben, der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung war ein hoher, aber etwas niedriger, als in den vorhergehenden Perioden.

Wenn wir die Größe des Prozentsatzes der Nichtaneignung des Stickstoffs der Nahrung nicht nach den einzelnen Perioden, sondern in der Reihenfolge des Versuchs vergleichen (Tabelle III), so können wir nicht umhin zu bemerken, daß bei langdauernder Fütterung des Meerschweinchens mit reinem Hafer der Prozentsatz der Nichtaneignung des Stickstoffs sich vergrößert (in der 1. Periode 25,2 Proz., in der 4. Periode 30,65 Proz.). Angefangen von der Zeit des Zusatzes von Kohl (6. Periode) hält sich, mit Ausnahme zweier scharfer Abweichungen in der 7. Periode (27,88 Proz.) und in der 12. Periode (31,00 Proz.), der Prozentsatz der Nichtaneignung unbedeutend schwankend auf ziemlich

niedrigem Niveau (18,66 bis 25,9 Proz.), aber darauf, näher zum Ende des Versuchs, beginnt er sich zu erhöhen (in der 15. Periode 32,65 Proz.) und erreicht seine größte Höhe in der 20. Periode, wo er 40,29 Proz. beträgt.

Die Resultate der beschriebenen Versuche auf diese Weise gegeneinander haltend, kann man zu folgenden Ergebnissen kommen:

1. Die ausschließliche Fütterung des Meerschweinchens mit Hafer wird bald ungenügend und ruft Erscheinungen von Dystrophie hervor. Die Annahme von Hafer und seine Aneignung sinkt und die Stickstoffbilanz wird negativ, d. h. das Tier fängt an, das Eiweiß seines Körpers zu verbrauchen.

2. Die positive Stickstoffbilanz wurde nur beim Zusatz zu Hafer von 40 g Kohl beobachtet, was auch die Aufnahme und Aneignung des Hafers verbesserte.

3. Der Zusatz von kleinen Dosen Kohl (20 bis 5 g) macht die Stickstoffbilanz nicht positiv, obgleich er im größeren oder geringeren Grade den Verbrauch des Eiweißvorrats des Körpers einschränkt. Der Effekt des Zusatzes dieser Dosen hängt von der vorhergehenden Nahrung ab.

4. Da die Bilanz nur beim Zusatz großer Dosen von Winterkohl positiv wird, wenn mit dem Kohl eine sehr bedeutende Quantität Eiweiß eingeführt wird, dessen Stickstoff in einigen Fällen über 50 Proz. desjenigen ausmacht, welcher gleichzeitig mit Hafer eingenommen wird, so drängt sich die Frage auf, ob in dem günstigen Effekt des Kohls nicht die in ihm enthaltenen Eiweißstoffe eine Rolle spielen, desto mehr, daß der Gang der Ausscheidung des Stickstoffs im Harn in diesen Perioden darauf hinweist, daß die Eiweißstoffe des Hafers zusammen mit dem Eiweiß des Kohls eine weit günstigere Kombination für ihre Ausnützung seitens des Organismus darbieten, als die Eiweißstoffe des Hafers allein. Diese Arbeit wurde unter der Leitung unseres Lehrers Herrn Prof. *Schaternikoff* ausgeführt.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 90.

Stoffwechseluntersuchung bei Tieren in parabiotischem Zustand.

Von

W. Kichikawa.

[Aus dem physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 25. September 1925.)

Die Parabiose gehört mit zu den wertvollsten Methoden der Erforschung der inneren Sekretion. Für eine Reihe von schwierigen Fragen hat die Methode der Parabiose in entscheidender Weise zur Beantwortung beigetragen. Wenn es sich darum handelt, den Beweis zu liefern, daß tatsächlich im Blute ein inneres Sekret da ist, welches regulierend auf die Funktion des Organismus wirkt, kann es kaum eine elegantere Beweisführung geben als die, daß man zwei Tiere parabiotisch miteinander vereinigt, von denen das eine in vollständiger Weise eines Organs mit innerer Sekretion beraubt ist. Wenn nun die Vereinigung zweier solcher Tiere bei dem des betreffenden Organs beraubten Tiere entweder das Auftreten von Ausfallsymptomen vollständig verhindert oder, was noch eindringlicher wäre, die schon aufgetretenen Ausfallsymptome minderte, wäre damit in zwingender Weise gezeigt, daß auf dem Blutwege die Änderung herbeigeführt würde und im Blute die chemischen Bedingungen lägen, daß sich das operierte Tier wieder dem normalen Zustand nähert. Beispiele solcher Beweisführung haben die glänzenden Arbeiten von *Sauerbruch* und *Heyde*[1]) erbracht. Im Berner physiologischen Institut ist auch diese Methode angewandt worden, und zwar von *Takakusu*[2]). Derselbe vernähte Kaninchen parabiotisch miteinander, von denen das eine

---

[1]) *Sauerbruch* und *Heyde*, Münch. med. Wochenschr. 1910, S. 2617; *Heyde*, Ergebn. d. Physiol. 1912, S. 564.

[2]) *Takakusu*, diese Zeitschr. **128**, 1922.

der Ovarien beraubt war. Nach seinen Befunden vermindert sich die Erregbarkeit des zentralen Nervensystems, geprüft an der durch Diuretin hervorgerufenen Hyperglykämie nach Verlust der Ovarien. Er konnte zeigen, daß durch die parabiotische Vereinigung mit einem normalen weiblichen Kaninchen die verminderte Erregbarkeit sich wieder hob. Daß die Methode nicht in größerem Umfange angewandt wird, liegt zum Teil an den nicht geringen methodischen Schwierigkeiten, zum Teil aber auch daran, daß die Lebensbedingungen, unter denen parabiotisch vereinigte Tiere existieren, noch nicht in dem Umfange bekannt sind, wie es wünschenswert ist. Parabiotisch vereinigte Tiere beeinflussen sich gegenseitig, und diese Beeinflussung kann eine sehr verwickelte sein. Schon *Heyde* hat in seiner vorhin erwähnten Zusammenfassung auf die hier in Betracht kommenden Gesichtspunkte hingewiesen.

Ehe man daran gehen kann, schwierigere Fragen, nicht hinreichend bekannte Funktionen betreffend, mit Hilfe der Parabiose zu entscheiden, ist es notwendig, den Einfluß der Parabiose auf die großen Elementarfunktionen des Organismus genauer festzustellen. Ich folgte in dieser Absicht der Anregung von Prof. *Asher*, um den respiratorischen Stoffwechsel im Zustande der Parabiose zu untersuchen. Der respiratorische Stoffwechsel hat sich als ein so feines Reagens zur Beurteilung des Zustandes und der Wertigkeit von verschiedenen Funktionen erwiesen, daß man wohl ohne Bedenken die Voraussetzung machen darf, daß der respiratorische Stoffwechsel auch für die Beurteilung der Parabiose ein ebenso gutes Kriterium abgeben wird, und wohl auch ein aufschlußreicheres als manche der bisher an parabiotischen Tieren ausgeübten Methoden. Zum Gelingen der Parabioseoperation und zur Erhaltung von parabiotisch vereinigten Tieren über eine längere Periode im guten Zustande sind eine Reihe von Vorbedingungen erforderlich, die ich versucht habe, besonders zu berücksichtigen. Aus verschiedenen Gründen wählte ich als Versuchstiere weiße Ratten. Zur Parabiose nahm ich stets gleichgeschlechtliche Tiere desselben Wurfes. Vom Gesichtspunkt meiner Untersuchung war es auch notwendig, daß sich die beiden Partner in annähernd gleichem Ernährungszustand befanden. Ich suchte daher Tiere aus, die nicht bloß vom gleichen Wurfe waren, sondern die auch ziemlich gleich schwer waren, und deren Körperentwicklung, soweit man das von außen beurteilen konnte, übereinstimmte. Das Körpergewicht der einzelnen zur Operation dienenden Ratten betrug durchschnittlich 80 bis 120 g.

Ich gehe jetzt zu einer Beschreibung meiner Operationsmethodik über.

Ich habe in meinen Versuchen die Parabiose durch Hautvernähung und Muskelbauchfellschichtvereinigung, also eine Dauervereinigung der

beiden Leibeshöhlen (Coelioanastomose) ausgeführt. Diese Methode stellte den gangbarsten und für die feste Verlötung sowie für den innigen Wechselverkehr aussichtsreichsten Weg dar. Die genauen Angaben und Beobachtungen, welche *Maeda* in seiner Arbeit aus der *Hotz*schen chirurgischen Klinik macht, waren mir in methodischer Hinsicht sehr wertvoll.

1 Stunde vor der Operation erhielten die Ratten subkutan 0,2 ccm einer 1 proz. Morphiumlösung. Die Haare der zu vereinigenden Körperseite der zwei auf dem Bauche nebeneinander gebundenen Tiere werden vorsichtig kurz geschoren.

Bei Ratten braucht man, wie sich aus der Schilderung von *Birkelbach* ergibt, nicht besonders vorsichtig mit der Asepsis zu sein. Die ausreichende Desinfektion des Operationsfeldes geschieht einfach durch Bepinselung mit 10proz. Jodtinktur.

Ich machte einen möglichst langen Hautschnitt von der Schenkelbeuge bis zur Achselhöhle. Die Gesamtlänge desselben beträgt etwa 8 bis 10 cm. Die hinteren Wundränder der beiden Tiere werden nun mit Catgut dicht fortlaufend zusammengenäht. Die Länge bzw. der Durchmesser der schlauchförmigen Verbindung der beiden Bauchfellhöhlen habe ich möglichst groß gestaltet, weil durch die Größe an dieser Vereinigungsstelle die Bedrohung der Darmeinklemmung verhindert wird. Nun wird zwischen den Partnern auf einmal durch das Bauchfell und durch die Muskelschicht mittels Catgut eine fortlaufende Ringnaht angelegt, deren einzelne Glieder sehr nahe aneinander gebracht wurden. Die vordere fortlaufende Naht der beiderseitigen Hautwundränder wird dann besonders sorgfältig eng an den oberen und unteren Wundwinkel angenäht.

Ich habe im ganzen 12 Fälle von parabiotischer Vereinigung ausgeführt. Ein Tierpaar lebte 2½ Monate in gutem Zustande in parabiotischer Vereinigung. Drei parabiotisch vereinigte Tiere lebten gleichfalls in gutem Zustande über 1 Monat. Sechs Paare parabiotisch vereinigte Tiere lebten über 14 Tage, nur zwei Paare starben am Tage nach der Operation.

Um meine Resultate bewerten zu können, bringe ich einen Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren, welche gleichfalls Parabiose ausgeführt haben. *Sauerbruch* und *Heyde* konnten unter 25 parabiotischen Kaninchenpaaren nur sechs Paare über 6 Wochen am Leben erhalten. *Matsuyama* konnte von 268 Rattenpaaren 71 Paare über 1 Monat am Leben erhalten. *Mayeda* gibt folgende Zahlen an: Von 30 Parabiosetieren gleichen Wurfes betrug die Lebensdauer nach der Parabioseoperation 1 Woche bei drei, 2 Wochen bei vier, 3 Wochen bei sieben, 4 Wochen bei vier, 5 Wochen bei einem, über 5 Wochen bei 11 Paaren.

Ehe ich an meine eigenen Versuche herantreten konnte, war es erforderlich, eine genaue Untersuchung darüber anzustellen, wie sich der Stoffwechsel durch Änderungen des Körpergewichts und Änderungen des Wachstums verändert, und zwar bei Ratten. Denn teils war das Gewicht meiner Ratten, die zu Vergleichsversuchen dienten, ver-

schieden, teils stand nach den vorliegenden Erfahrungen zu erwarten, daß das Körpergewicht der parabiotisch vereinigten Tiere abnehmen würde, teils konnten die Änderungen an den Ratten, die durch die Dauer der Versuche herbeigeführt wurden, den respiratorischen Umsatz ganz unabhängig von der Parabiose beeinflussen. Ich habe fünf Versuche angestellt, in welchen ich je zwei Ratten zusammen in der Respirationskammer untersucht habe. Nach dem Körpergewicht der beiden Tiere habe ich fünf Gruppen unterschieden und teile in der Tabelle I die Ergebnisse der zahlreichen Versuche an diesen fünf Gruppen von Doppeltieren mit.

Tabelle I.

a) Die physiologische Verschiebung des Stoffwechsels durch die Körpergewichtszunahme und das Wachstum.

Körpergewicht (2 Ratten zusammen) g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorie pro kg und Stunde
100—150 (20 Fälle)	0,7591	3,572	3,408	11,54
150—200 (20 „)	0,7531	3,074	2,995	10,13
200—250 (5 „)	0,7546	2,66	2,56	8,65
250—300 (10 „)	0,7724	2,483	2,337	7,93
300—400 (6 „)	0,7614	2,118	2,016	6,83

Es ergibt sich aus dieser Versuchsreihe, daß mit zunehmendem Körpergewicht die pro Kilogramm und Stunde Körpergewicht und Zeiteinheit gebildete Kohlensäure und der verbrauchte Sauerstoff merklich abnehmen. Sehr viel größer ist aber die Abnahme der aus dem Sauerstoffverbrauch errechneten Kalorien. Der respiratorische Quotient erhielt sich in den meisten Reihen annähernd konstant.

In bezug auf die Methodik brauche ich hier nur anzugeben, daß es die übliche Methodik des Berner physiologischen Instituts ist, die von *Asher* für Ratten modifizierte Methode von *Haldane* zur Untersuchung des respiratorischen Stoffwechsels.

Meine entscheidenden Untersuchungen über das Verhalten des respiratorischen Stoffwechsels habe ich an drei Paar parabiotisch vereinigten Ratten angestellt. Zuerst wurden die beiden zu vereinigenden Tiere gemeinschaftlich in der Respirationskammer auf ihren respiratorischen Stoffwechsel untersucht. In Tabelle II teile ich Versuche an dem ersten Paar Tiere vor und nach der Parabioseoperation mit.

Die Vorversuche dauerten vom 12. Februar bis 11. März. Es ergibt sich aus dieser Versuchsreihe, daß die Tiere im Laufe dieser Periode an Körpergewicht zunahmen. Dementsprechend sinkt, auf die Einheit des Körpergewichts und der Zeit berechnet, die Größe des Umsatzes in der Art und Weise, wie ich sie in meinen Vorversuchen

Tabelle II.

b) Der Grundumsatz vor und nach der Parabioseoperation.

Paar Nr. 1.

Datum	Körpergewicht g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorie pro kg und Stunde
12. II.	145,53	0,7772	3,505	3,276	11,14
16. II.	138,96	0,7264	3,215	3,215	10,83
23. II.	151,31	0,7981	3,679	3,349	11,42
26. II.	174,41	0,7762	3,577	3,348	11,38
6. III.	194,48	0,759	2,699	2,584	8,75
10. III.	138,73	0,731	2,65	2,632	8,86
11. III.	198,95	0,7947	2,731	2,496	8,51
12. III.		Parabioseoperation ausgeführt.			
20. III.	187,50	0,8516	3,44	2,947	10,15
25. III.	177,19	0,8	3,856	3,499	11,94
27. III.	190,05	0,7927	3,775	3,46	11,8
7. IV.	212,46	0,7423	2,754	2,695	9,1
16. IV.	219,64	0,7673	3,415	3,232	10,97
21. IV.	229,08	0,7789	3,078	2,871	9,76
30. IV.	255,31	0,7823	2,742	2,546	8,66

erkannt und beschrieben habe. Die Werte, die ich gefunden habe, bewegen sich in den bekannten normalen Grenzen. Am 12. März wurde die Parabioseoperation ausgeführt, und die Versuche an parabiotisch vereinigten Tieren begannen am 20. März, zu einer Zeit, wo die Tiere vollständig wieder hergestellt waren. Die Versuche dauerten vom 21. März bis zum 30. Juni. Der gute Zustand der Tiere innerhalb dieser Versuchsperiode ergibt sich sehr deutlich aus dem Körpergewicht. Vor der Operation betrug dasselbe 198 g. Nach einem kurzen Fallen bis auf 177 g bis zum 25. März stieg das Körpergewicht bis zum 30. April bis auf 255 g. Die Tiere waren daher in einem hinreichend guten Zustande, um den etwaigen Einfluß der Parabiose auf die Größe des respiratorischen Stoffwechsels feststellen zu können.

Ich will die gefundenen Zahlen mit denjenigen vergleichen, welche ich bei Tieren gleichen Körpergewichts festgestellt habe. Am 16. April war das Körpergewicht der Tiere rund 220 g. Die Kohlensäurebildung pro Kilogramm und Stunde betrug 3,415, der Sauerstoffverbrauch 3,232, die Kalorienzahl pro Kilogramm und Stunde 10,97. Bei normalen Doppelratten mit einem Gewicht von 200 bis 250 g fand ich für die Kohlensäurebildung 2,6, für den Sauerstoffverbrauch 2,56, für die Kalorienzahl 8,65. Nach diesem Vergleich wäre eine immerhin merkliche Erhöhung des respiratorischen Umsatzes zu konstatieren. Am 21. April betrug das Körpergewicht rund 230 g, die Kohlensäurebildung pro Kilogramm und Stunde 3,07, der Sauerstoffverbrauch 2,871, die

Kalorienzahl 9,76. Diese Werte können verglichen werden mit den vorher benutzten Werten an normalen Tieren zwischen 200 und 250 g. Auch hier zeigt sich immer noch eine Steigerung des Grundumsatzes. Am 30. April, wo das Körpergewicht 255 g betrug, war die Kohlensäurebildung 2,742, der Sauerstoffverbrauch 2,546, die Kalorienzahl 8,66. Diesen Wert will ich mit dem letzten Normalwert der beiden Tiere vergleichen, der am 11. März erhoben wurde. An diesem Tage betrug das Körpergewicht der beiden Tiere rund 199 g. Es belief sich die Kohlensäurebildung pro Kilogramm und Stunde auf 2,731, der Sauerstoffverbrauch auf 2,496, die Kalorienzahl auf 8,51. Die Zahl für das rund 260 g wiegende, parabiotisch vereinigte Rattenpaar war etwa von der gleichen Größe. Da nun das Körpergewicht rund 60 g schwerer ist, ist tatsächlich der respiratorische Umsatz merklich gesteigert. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe wäre dahin zu formulieren, daß durch die parabiotische Vereinigung im vollständig normalen Zustande der vereinigten Tiere ein im Vergleich zu ihrem Körpergewicht gesteigerter respiratorischer Umsatz vorhanden ist. Diese Konstatierung schien mir von Interesse zu sein, selbst wenn ihre Erklärung nicht leicht sein dürfte. Als pathologisch kann man diese Steigerung nicht bezeichnen, und zwar deshalb nicht, weil der Zustand der Tiere während der Versuchsperiode ein sehr guter war. Es können daher besondere Anregungen vorhanden sein, die den Stoffwechsel etwas über die Norm erhöhen. Es ist vielleicht die Anregung des Stoffwechsels dem Einfluß des zwar artgleichen, aber individuell verschiedenen Blutes zuzuschreiben.

Qualitativ verhält sich, wie sich aus dem respiratorischen Quotienten ergibt, der Stoffwechsel unverändert. Woraus wiederum gefolgert werden darf, daß die von mir beobachtete Erscheinung im Rahmen des physiologischen sich abspielt.

Meine nächste Versuchsreihe wurde an zwei Ratten angestellt, die ich im normalen Zustande vom 2. bis 18. Mai beobachtete. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bringe ich in Tabelle III.

Die Tiere nehmen in dieser Versuchsreihe von rund 159 auf 261 g zu. Entsprechend vermindert sich der respiratorische Stoffwechsel. Am 2. Mai war die Kohlensäurebildung 3,65, Sauerstoffverbrauch 3,378, Kalorienzahl 11,51. Am 18. Mai betrugen die Werte für Kohlensäurebildung 2,715, für Sauerstoffverbrauch 2,561, für die Kalorienbildung 8,69. Am 19. Juni wurde die Parabioseoperation ausgeführt. Die Beobachtung begann am 29. Mai und wurde bis zum 18. Juni in vollständig gesundem Zustande fortgesetzt. Um die erhaltenen Werte zu beurteilen, will ich sie zunächst wiederum mit den Werten von Tieren gleichen Gewichts vergleichen. Am Ende der Versuchsreihe betrug das Körpergewicht 265 g, also nur wenig mehr als am Tage vor der

Tabelle III.

Paar Nr. 6.

Datum	Körpergewicht g	Respirations-quotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorie pro kg und Stunde
2. V.	158,78	0,785	3,65	3,378	11,51
5. V.	157,88	0,754	4,054	3,906	10,48
8. V.	171,14	0,757	2,922	2,805	9,5
12. V.	207,07	0,7462	2,741	2,668	9,02
15. V.	248,41	0,745	2,818	2,747	9,29
18. V.	260,65	0,77	2,715	2,561	8,69
19. V.	Parabioseoperation ausgeführt.				
29. V.	253,55	0,77	3,215	3,027	10,27
2. VI.	237,59	0,80	2,841	2,578	8,8
5. VI.	241,34	0,7794	2,523	2,352	8,0
9. VI.	260,20	0,848	3,023	2,588	8,91
15. VI.	264,89	0,765	2,435	2,313	7,85
18. VI.	265,17	0,7757	2,665	2,502	8,51

Operation, wo es rund 261 g betrug. Es zeigt sich nun, daß der respiratorische Umsatz am 18. Mai und am 18. Juni annähernd der gleiche ist.

Bei normalen Tieren zwischen 250 und 300 g sind die Werte für Kohlensäurebildung, Sauerstoffverbrauch und Kalorienbildung etwas kleiner, aber die Unterschiede sind nicht ins Gewicht fallend, so daß als Gesamtergebnis dieser Versuchsreihe eine Unverändertheit des respiratorischen Stoffwechsels bei gelungener Parabiose anzusprechen ist.

In meiner letzten Versuchsreihe habe ich Beobachtungen an dem normalen Paare in der Zeit vom 5. Mai bis 15. Juni angestellt. In dieser Zeit nahm das Körpergewicht der Tiere von 124 auf 176 g zu.

Tabelle IV.

Datum	Körpergewicht g	Respirations-quotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorie pro kg und Stunde
5. V.	124,15	0,8276	4,007	3,517	12,07
7. V.	124,70	0,74	3,328	3,268	11,03
11. V.	153,36	0,73	3,228	3,212	10,82
13. V.	167,14	0,731	3,45	3,43	11,55
15. V.	176,26	0,73	2,865	2,851	9,60
19. V.	Parabioseoperation ausgeführt.				
29. V.	190,40	0,7999	4,202	3,729	12,72
2. VI.	172,28	0,7968	3,613	3,294	11,24
5. VI.	180,70	0,7893	3,473	3,196	10,9
8. VI.	189,74	0,7636	3,031	2,883	9,76
9. VI.	184,75	0,7532	2,666	2,571	3,69
16. VI.	190,01	0,7334	2,763	2,737	9,217

Am 19. Mai wurde die Parabioseoperation ausgeführt. Am 29. Mai begannen die Versuche im respiratorischen Apparat. Das Ergebnis dieser Reihe bringe ich in Tabelle IV.

Das Körpergewicht blieb in dieser Zeit annähernd gleich, das bedeutet, daß durch die Parabiose trotz des anscheinend guten Zustandes der Tiere immerhin ein gewisser Rückschritt eingetreten ist. Denn unter ganz normalen Bedingungen dürfte erwartet werden, daß die Tiere noch etwas an Körpergewicht zugenommen hätten, das haben wir ja auch in der ersten Versuchsreihe gesehen. Die erste Folge der Operation war in diesem Falle in der Zeit bis zum 5. Juni eine merkliche Steigerung des Stoffwechsels. Da die beiden Tiere in gutem Zustande waren, auch am 29. Mai gegenüber dem letzten Tage vor der Operation an Körpergewicht zugenommen hatten, darf man wohl in dieser Steigerung des Grundumsatzes den Ausdruck der Beeinflussung der beiden Tiere durch die Parabiose erblicken, und zwar durch die Folge der Vermischung von individuell verschiedenem Blute. Im weiteren Verlauf der Versuche nimmt der Umsatz wieder ab und erreicht normale Werte.

Zusammengefaßt, ist das Ergebnis meiner Arbeit das nachfolgende:

1. Untersucht man zwei Ratten gleichzeitig im respiratorischen Apparat über längere Perioden, so läßt sich sehr deutlich der Einfluß der Körpergewichtsveränderung und der Zeitdauer auf die Durchschnittswerte des respiratorischen Stoffwechsels erkennen.

2. Parabiotisch vereinigte Ratten lassen sich gut auf ihren respiratorischen Stoffwechsel im Apparat von *Haldane* und *Asher* untersuchen.

3. Parabiotisch vereinigte Ratten zeigen ein zweifaches Verhalten im respiratorischen Stoffwechsel, derselbe ist entweder leicht gesteigert, oder er ist normal, alles unter der Voraussetzung, daß die beiden Tiere in gutem Zustande sich befinden. Die leichte Steigerung des Grundumsatzes kann auf eine Anregung des Umsatzes durch individual verschiedenes Blut bezogen werden.

Literatur.

Birkelbach, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therapie 8, 465, 1910. — *N. Goto*, Arch. f. Gynäkol. (in Druck). — *M. Heyde*, Ergebn. d. Physiol. 1912, S. 564. — *T. Maeda*, Deutsch. Zeitschr. f. Chirurgie **167**, H. 5/6, 1921. — *Matsuyama*, Frankf. Zeitschr. f. Pathol. 25, 1921. — *Morpurgo*, Münch. med. Wochenschr. 1908, S. 2446. — *Pflüger*, Arch. f. d. ges. Physiol. **124**, 1908. — *Sauerbruch* und *Heyde*, Münch. med. Wochenschr. 1910, S. 2617. — *G. Schmidt*, Handb. d. biol. Arbeitsmethod. (*E. Abderhalden*) 1922. — *Takakusu*, diese Zeitschr. **128**, 1922.

Anhang.

Einzelversuche zur Prüfung des Stoffwechsels durch die Körpergewichtszunahme und das Wachstum.

Körpergewicht (2 Ratten zusammen) g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorie pro kg und Stunde
92,74	0,7466	3,99	3,882	
93,97	0,7398	4,416	4,337	
113,43	0,7665	3,791	3,593	
121,60	0,7860	4,338	4,009	
124,15	0,8276	4,007	3,517	
124,44	0,7869	3,83	3,536	
124,70	0,7417	2,927	2,867	
128,74	0,7614	3,379	3,224	
131,27	0,7841	4,399	4,066	
135,13	0,7488	3,09	2,997	
135,70	0,7387	3,316	3,261	
136,09	0,7729	3,361	3,16	
136,35	0,7441	3,117	3,043	
132,90	0,7478	3,292	3,198	
137,91	0,7585	3,426	3,281	
138,96	0,7264	3,215	3,215	
139,05	0,7378	3,433	3,38	
140,42	0,735	3,045	3,009	
145,53	0,7772	3,505	3,276	
90,150	0,7591	3,572	3,408	11,54
151,31	0,7981	3,679	3,349	
153,36	0,7301	3,228	3,212	
154,95	0,7424	3,001	2,936	
157,88	0,7531	4,054	3,906	
158,78	0,7851	3,65	3,378	
161,36	0,7384	2,866	2,820	
167,14	0,7307	3,45	3,43	
160,31	0,7303	2,979	2,97	
165,15	0,7656	3,255	3,088	
171,14	0,7567	2,922	2,805	
172,60	0,7832	2,998	2,781	
174,41	0,7962	3,577	3,348	
176,26	0,73	2,865	2,851	
181,79	0,7341	2,613	2,585	
190,01	0,7334	2,763	2,737	
194,48	0,759	2,699	2,584	
195,60	0,7506	3,170	3,067	
197,73	0,7388	3,022	2,971	
198,73	0,7309	2,65	2,632	
198,95	0,7949	2,731	2,496	
150,200	0,7531	3,074	2,995	10,13
206,73	0,7780	2,919	2,725	
207,07	0,7462	2,741	2,668	
248,41	0,7451	2,818	2,747	
248,80	0,7434	2,345	2,291	
248,95	0,7603	2,481	2,370	
200,250	0,7546	2,66	2,56	8,65

Körpergewicht (2 Ratten zusammen) g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorie pro kg und Stunde
260,65	0,77	2,715	2,561	
261,44	0,7632	2,381	2,266	
265,16	0,7459	2,412	2,351	
265,17	0,7757	2,665	2,502	
270,70	0,7294	2,758	2,684	
274,23	0,7737	2,188	2,054	
284,56	0,7365	2,577	2,542	
285,08	0,8229	2,093	1,847	
287,37	0,7987	2,818	2,563	
296,77	0,8080	2,224	1,999	
250,300	0,7724	2,483	2,337	7,93
301,37	0,7351	2,099	2,074	
309,98	0,865	2,517	2,267	
337,12	0,7447	1,809	1,765	
354,28	0,7474	1,764	1,715	
370,70	0,7502	2,124	2,057	
375,58	0,7845	2,396	2,219	
300,400	0,7614	2,118	2,016	6,83

Zur Frage nach dem Mechanismus der Darmsekretion.

IV. Mitteilung:

Über die Einwirkung einiger zurzeit bekannten quaternären Ammoniumbasen des Fleischextraktes auf die Darmsekretion.

Von

S. A. Komarow.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Riga.)

(Eingegangen am 31. Oktober 1925.)

Vor nicht langer Zeit ist bekanntlich auch eine Reihe von quaternären Ammoniumbasen als Bestandteile des Muskelgewebes beschrieben worden, und zwar Cholin, Carnitin, Novain, Oblitin, Carnomuscarin, Neurin, Neosin und neuerdings auch Myokinin. In dieser Arbeit, in welcher hauptsächlich nach der Existenz einer chemischen Korrelation in der Tätigkeit des Muskelgewebes einerseits und der Darmdrüsen andererseits gesucht wird, sollte, unseres Erachtens, eine besondere Aufmerksamkeit dem Carnitin und dem Cholin zugewandt werden.

Das zuerst von *Gulewitsch* und *Krimberg* (1) im *Liebig*schen Fleischextrakt entdeckte Carnitin wurde bald darauf von *Krimberg* (2) auch aus den Muskeln des Stieres als deren präformierter Bestandteil isoliert. Auf Grund der zuerst von *Krimberg* ausgeführten Versuche ist das Carnitin als eine zur Gruppe der Betaine gehörige Base, und zwar als ein Oxy-γ-Butyrobetain sichergestellt. Zur gleichen Zeit ist von ihm die Vermutung ausgesprochen worden, daß die Oxygruppe sich höchstwahrscheinlich in der β-Stellung im Carnitinmolekül befindet (3). Spätere, meist im Laboratorium von *Gulewitsch* ausgeführte Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Base in den Muskeln sehr verschiedener höherer Tiere — des Kalbes (4), Pferdes (5), Schweines (5) und Hundes[1]) — sowie in den Skelettmuskeln des Menschen (6) ganz regelmäßig vorhanden ist. Die in *Krimbergs* Laboratorium (Charkow) angestellten Versuche ergaben deutlich, daß das Carnitin alle Zeichen eines wahren Hormons besitzt, weil dasselbe direkt ins Blut oder subkutan eingeführt eine bedeutende Sekretion des Magensaftes sowie Blutdruckerniedrigung zu bewirken imstande ist (7). Aus diesem Grunde ist es klar, daß das Studium des eventuellen Einflusses des Carnitins auf die Tätigkeit der Darmdrüsen notwendigerweise in dieser Arbeit Platz finden muß.

---

[1]) *S. Komarow*, noch nicht publiziert.

Obwohl das Cholin auf streng chemischem Wege bis jetzt nur von *Kutscher* (8) aus einigen Portionen des *Liebig*schen Fleischextraktes und neuerdings auch von *Smorodinzew* (5) aus einer Schweinefleischportion isoliert worden ist, kann doch kaum bezweifelt werden, daß diese Substanz welche man ja in allen darauf untersuchten tierischen Geweben und Flüssigkeiten aufgefunden hat, ebenfalls als ein präformierter Bestandteil des Muskelgewebes zu betrachten ist. Diese Base besitzt, wie bereits längst bekannt, eine vielseitige physiologische Aktivität; unter anderem eignet ihr auch eine stark ausgeprägte Wirksamkeit in bezug auf die Magen- und Pankreassaft-, sowie auf die Gallen- und Speichelsekretion (9). Es ist uns jedoch nicht gelungen, in der Literatur irgendwelche Angaben in betreff des Verhaltens der Darmsekretion dem Cholin als solchem gegenüber zu finden, was unser Bestreben, diese Lücke womöglich auszufüllen, als vollständig berechtigt erscheinen läßt.

Von *Kutscher* (10) und seinen Mitarbeitern sind bekanntlich auch noch mehrere andere Substanzen, nämlich das Novain, Oblitin, Carnomuscarin, Neurin und Neosin aus dem Fleischextrakte isoliert und als dem Cholin verwandte Stoffe beschrieben worden. Nach den Untersuchungen von *Krimberg* hat sich nun erwiesen, daß das Novain mit dem von *Gulewitsch* und *Krimberg* schon früher entdeckten Carnitin identisch ist (11), und daß das Oblitin als ein bei der Bearbeitung des Fleischextraktes sekundär entstandenes Carnitinderivat, und zwar als sein Äthylester betrachtet werden muß (12). Das Carnomuscarin und das Neurin sind von *Kutscher* nur in sehr geringen Mengen und durchaus nicht regelmäßig, eher selten aus einzelnen Portionen des *Liebig*schen Fleischextraktes isoliert worden. Auch das Neosin fehlt ebenfalls häufig im *Liebig*schen Fleischextrakt, soll jedoch manchmal in frischen Muskeln anzutreffen sein (13). In geringen Mengen ist neuerdings im Hunde- und Pferdemuskel und auch im Muskelgewebe des Menschen noch das ebenfalls in diese Gruppe gehörige Myokinin, welches seiner Konstitution nach Ornithinbetain vorstellen soll, gefunden worden [*Ackermann* (14)]. Von allen diesen quaternären Ammoniumbasen dürften also vielleicht nur das Neosin und das Myokinin zu den präformierten Bestandteilen des Muskelgewebes hinzugerechnet werden.

Über die Einwirkung des Cholins auf die Darmsekretion.

Eine exaktere experimentelle Untersuchung der physiologischen Aktivität des Cholins stößt auf einige Schwierigkeiten, welche ihren Grund in der chemischen Natur dieses Körpers haben. Das Cholin, nicht nur als freie Base, sondern auch als Chlorid bzw. Bromid, welche bei physiologischen Untersuchungen meist angewandt werden, ist nämlich eine sehr unbeständige, leicht unter Abspaltung von Trimethylamin zersetzliche Substanz. Daher ist es schwer, ein einwandfreies, zur Einführung in den Organismus geeignetes Präparat ausfindig zu machen. Bekannterweise riechen selbst die von den Fabriken als reinste gelieferten Cholinpräparate stets nach Trimethylamin und können somit keineswegs als tatsächlich reine Präparate betrachtet werden. Es darf jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß die meisten in der zurzeit bereits sehr umfangreichen Literatur mitgeteilten Versuche

unter Anwendung derartiger käuflicher Cholinchlorid- und -bromidpräparate ausgeführt worden sind. In dieser Arbeit legten wir nun ganz besonders Gewicht darauf, ein vollständig reines Cholinpräparat für unsere Experimente zu verwenden.

Das käufliche Cholinchlorid (*Merck*), welches wir zur Verfügung hatten stellte große, gelblichweiße, ein wenig zerflossene Kristalle mit starkem Trimethylamingeruch dar. Zur Reinigung wurde dasselbe in einer möglichst geringen Menge absoluten warmen Alkohols gelöst und die Lösung mit Schwefeläther bis zur Entstehung einer leichten Trübung versetzt. Nach zweistündigem Stehen in einem mit konzentrierter Schwefelsäure beschickten Exsikkator erstarrte die Lösung zu einer kristallinischen Masse. Die Kristalle wurden scharf abgesaugt, dreimal mit Alkoholäther (1 : 1) und einmal mit Äther gewaschen. Die so erhaltenen schneeweißen Kristalle wurden im ebenfalls mit Schwefelsäure beschickten Vakuumexsikkator aufbewahrt. Während einer Woche, in deren Verlauf das Präparat zu den betreffenden Versuchen benutzt wurde, ließ sich nicht auch der mindeste Trimethylamingeruch wahrnehmen. Zum Ende der Woche wurde eine Elementaranalyse vorgenommen.

0,1891 g Substanz geben 0,1937 g AgCl.

$C_5H_{14}NOCl$. Ber.: Cl = 25,39 Proz.
(139,607) Gef.: Cl = 25,34 „

Nach Ablauf einer weiteren Woche veränderte sich das Präparat merklich in der Weise, daß ein deutlicher Trimethylamingeruch bereits feststellbar war. Deshalb wurde für jeden weiteren Versuch dieses Präparat einige Tage vor demselben auf gleiche Art und Weise umkristallisiert; so daß in dieser Untersuchung niemals mehr als 7 Tage altes Präparat zur Verwendung kam. Die zur Einverleibung bestimmten Lösungen wurden stets mit frisch umdestilliertem Wasser steril unter Vermeidung jeglicher Erwärmung bei Zimmertemperatur unmittelbar vor der Injektion zubereitet.

Als Objekt unserer ersten Versuche über das Verhalten der Darmsekretion dem Cholin gegenüber dienten uns die bereits in meinen früheren Mitteilungen (15) beschriebenen Versuchstiere — Hund 3 und 4 —, welchen also vor 20 bis 30 Monaten je eine *Thiry-Vella*sche Fistel des oberen Jejunums angelegt worden war. Die Versuche wurden stets an nüchternen Tieren angestellt, deren letzte Fütterung meist zwischen 4 und 5 Uhr nachmittags am Vortage erfolgte.

Es wurden Cholingaben von 30 bis 5 mg pro Kilogramm Gewicht geprüft. Dabei stellte es sich heraus, daß irgendwelche Steigerung der Darmsekretion bei solcher Versuchsanordnung in der Regel nicht zu beobachten war. In den Versuchen, wo das Cholin in die Blutbahn direkt eingeführt wurde, konnten gar keine wahrnehmbaren Veränderungen im Gange der bei nüchternen Tieren normal zu beobachtenden „periodischen" Sekretion festgestellt werden (vgl. Versuche 5, 6, 7). Die Einführung des Cholins unter die Haut dagegen scheint eher eine Hemmung der normalen „periodischen" Sekretion zu verursachen (vgl. Versuche 1, 3, 4).

Nur in einem einzigen Falle dieser Versuchsreihe (Versuch 2) trat eine nicht unbeträchtliche Sekretionszunahme auf, welche wir jedoch als eine ganz zufällige Erscheinung anzusehen geneigt sind. In dieser Meinung bestärkt uns der Umstand, daß beim Versuch 1, welcher am vorhergehenden

Versuch 1.

Hund 3 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel). Gewicht 8 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 7 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins etwa 33 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
1h00′	—	85	Beginn der Beobachtung
1 45	0	85	
2 00	2,6	85	
2 45	0	85	*Injektion: 0,3 g salzsaures Cholin*, subkutan (10 proz. Lösung)
2 46	0	120	Beleckt sich
2 50	0	120	Beleckt sich häufig; Knurren in den Gedärmen
3 00	0,2	120	Beleckt sich häufig
3 15	0,6	100	Beleckt sich selten
3 30	0,8	85	
3 45	0	85	Beleckt sich nicht mehr
4 00	0,2	85	
4 30	0	85	
4 45	0,8	85	
5 15	0	85	
5 30	1,0	85	
6 00	0	85	

Versuch 2.

Hund 3 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel). Gewicht 8 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 7 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins etwa 26 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
12h00′			Beginn der Beobachtung
12 30	0	85	
12 45	1,4	85	
1 00	1,0	85	
1 45	0	85	
2 00	2,2	85	
2 35	0	85	*Injektion: 0,24 g salzsaures Cholin*, subkutan (3 proz. Lösung)
2 50	0	72—80	
3 00	0,2	85	Beleckt sich selten
3 15	3,3	85	
3 30	1,0	85	
3 45	0,5	85	
4 00	0,3	85	
4 15	0	85	
4 30	0,2	85	
4 45	1,1	85	
5 00	0,7	85	
5 45	0	85	
6 00	0,5	85	

Versuch 3.

Hund 3 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel). Gewicht 8 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins etwa 16,5 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
3h45'			Beginn der Beobachtung
4 00	0	—	
4 15	1,5	—	
5 00	0	—	
5 15	1,4	—	
6 00	0	85	
6 05	0	85	*Injektion: 0,15 g salzsaures Cholin*, subkutan (4,5 proz. Lösung)
6 07	0	90	Beleckt sich häufig
6 10	0	90	
6 20	0,2	85	
6 45	0	80	Beleckt sich selten
7 00	0	80	
7 15	1,0	80	
7 30	0,4	80	Beleckt sich nicht mehr
8 00	0	80	
8 15	1,1	80	
8 30	0	80	

Versuch 4.

Hund 3 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel). Gewicht 8 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins etwa 6,6 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
4h00'			
4 15	1,3	85	
5 00	0	85	
5 08	0	85	*Injektion: 0,06 g salzsaures Cholin*, subkutan (2 proz. Lösung in 0,85 proz. NaCl)
5 10	0	115	
5 16	↗	110	
5 30	0,4	85	
5 45	0,3	85	
6 45	0	85	
7 00	1,4	85	
7 15	0,5	85	
7 30	0	85	
7 45	0,7	85	
8 00	0,4	85	

Versuch 5.

Hund 3 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel). Gewicht 8 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins 19 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
2h15'			Beginn der Beobachtung
4 00	0	85—95	
4 15	1,3		
4 30	1,0		
5 00	0		
5 15	0,5		
5 25	0	95	*Injektion: 0,17 g salzsaures Cholin*, intravenös (2,8 proz. Lösung)
5 25—26'	0	110	Dyspnoe; Tränenfluß
5 40'	0	100	Beleckt sich häufig
5 55	0	85	
6 00	0,9	85	Wiederholter Stuhldrang; häufiges Knurren in den Gedärmen; sehr unruhig
6 15	0,4	85	
7 15	0	85	Ruhig
7 30	1,0	85	
8 00	0	85	

Versuch 6.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins 4,5 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
12h00'			Beginn der Beobachtung
2 00	0	—	
2 15	0,8	—	
2 30	1,2	—	
3 30	0	—	
3 45	0,3	—	
4 00	0,2	90	
4 06	0	90	*Injektion: 0,07 g salzsaures Cholin*, intravenös, im Laufe von etwa 30 Sekunden (1 proz. Lösung in 0,85 proz. NaCl)
4 06—07'	0	85—110	Dyspnoe; Speichelfluß
4 10'	0	110	Beleckt sich; Knurren in den Gedärmen
4 15	0	100	Beleckt sich nicht mehr
4 45	0	100	
5 00	1,0	90	
5 30	0	90	
5 45	0,7	90	
7 15	0	90	
7 30	1,2	90	
8 00	0	90	

Versuch 7.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins 9,5 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
10h30′			Beginn der Beobachtung
11 00	0	—	
11 15	1,8	—	
2 00	0	—	
2 15	1,0	—	
2 30	1,5	—	
3 00	0	—	
3 10	0	95	*Injektion: 0,15 g salzsaures Cholin*, intravenös im Laufe von 20 Sekunden (2,5proz. Lösung)
3 10—11′	0	60—70	Dyspnoe; Speichelfluß; Pulsus durus
3 20	0	100	Knurren in den Gedärmen; Pulsus mollis; beleckt sich häufig
3 30	1,5	95	Puls von normaler Spannung; beleckt sich nicht mehr
3 45	0,7	95	
4 15	0	95	
4 30	1,6	95	
5 30	0	95	

Tage bei Anwendung einer etwas größeren Cholindosis unter sonst ganz gleichen Bedingungen vorgenommen wurde, ebenfalls eine der Regel entsprechende Darmsekretionshemmung festgestellt werden konnte.

Bei Beurteilung dieser Ergebnisse sind zwei Momente zu beobachten. Erstens, daß die Schleimhaut der isolierten Darmschlinge bei unseren Versuchstieren als eine normale, vollständig gesunde angesehen werden muß. Hiervon überzeugt uns besonders die bei erwähnten Hunden während vieler Monate stets mit einer bewunderungswürdigen Regelmäßigkeit sich entfaltende spontane „periodische“ Tätigkeit der Drüsen des losgetrennten Darmabschnittes. Dafür spricht auch das während derselben Zeit unverändert gebliebene Verhalten der Drüsen derart sicheren, vielfach geprüften Sekretionserregern, wie z. B. mechanischen Reizen, Pilocarpin und dergleichen gegenüber. Zweitens, daß die charakteristische allgemeine Wirkung des Cholins, auf deren nähere Schilderung wir untenstehend werden zurückkommen müssen, in allen hier in Betracht gezogenen Versuchen sehr klar zum Vorschein kam. Insbesondere sollen als einzelne auffallende Wirkungserscheinungen, die hierbei scharf ausgeprägte Salivationssteigerung und die typische Wirkung auf den Blutkreislaufapparat hervorgehoben werden.

Zieht man all dieses in Erwägung, so könnte man zu der Schlußfolgerung gelangen, daß das Cholin in den von uns verwendeten Gaben überhaupt keine direkte erregende oder gar hemmende Wirkung auf

die Darmsekretion ausübt. In meinen früheren Mitteilungen (15) ist jedoch über einen engen Zusammenhang zwischen Magen- und Darmsekretion berichtet worden. Wir konnten nämlich nachweisen, daß der in den Dünndarm bzw. in das Duodenum hineingelangende saure Magensaft unter Umständen eine deutlich hemmende Wirkung auf die Tätigkeit der Drüsen des isolierten Darmteiles auslöst; so daß z. B. die spontane „periodische" Sekretion in diesem Falle auf mehrere Stunden sogar vollständig aufgehoben wird. Da andererseits in der Literatur einige Angaben über die Fähigkeit des Cholins eine Magensekretion zu erregen, vorkommen, so hätten wir bei der Betrachtung der oben beschriebenen Versuche mit der Möglichkeit zu rechnen, daß in denselben der unter dem Einfluß des einverleibten Cholins sezernierte Magensaft vom Duodenum aus die eventuelle primäre Erregung der Drüsen des isolierten Darmabschnittes sekundär zur Hemmung brächte, was als Endresultat keine sichtbare Wirkung auf die Darmsekretion oder gar eine Hemmung derselben zur Folge hätte. Besonders leicht könnte dieses eintreten, wenn die in Frage kommende eventuelle erregende Cholinwirkung auf die Darmsekretion noch nicht allzu bedeutend gewesen wäre.

Durch weitere Untersuchungen glauben wir die vollständige Richtigkeit obiger Erwägungen wohl bestätigt zu haben. Es hat sich nämlich erwiesen, daß das Cholin tatsächlich eine obwohl ziemlich schwache, aber immerhin ganz deutliche Wirksamkeit hinsichtlich der Drüsentätigkeit des unter Schonung der mesenterialen Nerven isolierten Darmabschnittes besitzt, und zwar im Sinne einer Sekretionsförderung. Dieselbe tritt aber nur dann zutage, wenn ein leichtes und vollständiges Herausfließen des sich unter der Einwirkung des Cholins ebenfalls ausscheidenden Magensaftes durch eine genügend weite Metallkanüle ermöglicht worden ist.

Diese Beziehungen waren besonders in den Versuchen sehr klar ausgeprägt, welche am Hunde 4 angestellt wurden, dem vorher eine 18 mm weite Kanüle in den Fundusteil des Magens eingenäht worden war.

Obwohl wir uns im vorliegenden Aufsatz zur näheren Aufgabe eigentlich ein spezielles Studium der Cholineinwirkung auf die Darmsekretion gestellt hatten, schien es uns doch nicht überflüssig zu sein, auch einige andere von uns beobachtete Erscheinungen der Cholinwirkung etwas eingehender zu schildern; vor allem deshalb, weil unserer festen Überzeugung nach die von uns in den betreffenden Versuchen verwandten Cholinlösungen bis zum allerletzten Einverleibungsmoment außer dem einwandfrei reinen Cholin sicher keinen anderen organischen Stoff enthielten, und weil unseres Wissens in der Literatur bis jetzt nur wenige unter so peinlicher Beachtung dieses Punktes durchgeführte Versuche mitgeteilt worden sind.

Das Wirkungsbild des Cholins tritt aufs deutlichste im Versuch 8 zutage, wo sein salzsaures Salz in einer Menge von 0,6 g, was 37 mg

Versuch 8.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins 37 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
3h00'	—	Schleim alkalisch	95—100	Beginn der Beobachtung
3 30	0			
3 45	1,8			
4 00	0,2			
4 45	0			
5 00	1,4			
5 55	0			
5h55-56,5'	0		95—25—50 durus	*Injektion: 0,6 g salzsaures Cholin*, intravenös, im Laufe von etwa 90 Sek. (5proz. Lösung)
5h55,5'	0		50 durus	Dyspnoe, Speichelfluß, Schleim- und Tränenabsonderung, Erbrechensbewegungen, Knurren in d. Gedärmen.
5 58	0		90 „	
6 00	0 ↗	Schleimhaut sauer	>200 mollis	Krämpfe der gesamten Muskulatur, Atmungsstillstand, konjunktivale Reflexe fehlen, Puls kaum wahrnehmbar, künstliche Atmung. Aus der Magenfistel scheiden sich einige Kubikzentimeter Galle u. viel Speichel ab, häufiges Knurren in den Gedärmen
6 03	+		150 „	
6 10	0,5	4,0 (Gesamtacidität = 40, freie HCl = 0)	150 mollis	
6 15	3,3	11,0	110 „	
6 30	1,2	2,0	110 (Spannung normal)	Beleckt sich häufig, Knurren in den Gedärmen
6 45	1,2	2,0	110	
7 00	0,4	1,0	110	
7 15	0,2	Schleim alkalisch	110	
7 30	0,3		110	
8 30	0		110	
8 45	1,0		110	
9 00	0		110	

freier Base pro Kilogramm Gewicht entspricht, in die V. jugularis ext. während etwa 60 Sekunden injiziert wurde. Ihrer Wirkung nach beurteilt, ist diese Gabe gewiß als eine der letalen sehr nahe stehende anzusehen, da die Reaktion seitens des Organismus so stürmisch war, daß man um das Leben des Tieres ernstlich besorgt sein mußte. Schon 10 bis 15 Sekunden nach Beginn der Injektion wurde die Atmung sehr tief und häufig, gleichzeitig verlangsamte sich der Puls (bis auf zwei Schläge in 5 Sekunden) und nahm stark in seiner Spannung zu; nach noch einigen Sekunden zeigten sich Tränen in den Augen, viel Speichel aus der Mundhöhle und Schleim in den Nasenlöchern. Nach Ablauf einer weiteren Minute waren als Zeichen einer Steigerung der motorischen Tätigkeit des Magendarmkanals auch deutlich wahrnehmbares, fortdauerndes Knurren in der Bauchgegend und Abgang von Gasen aus dem Rektum zu konstatieren. Schließlich, gegen Ende der Einspritzung, traten bei sehr starker Beschleunigung des Pulses und

Abnahme seiner Füllung heftige Erbrechensbewegungen (bei leerem Magen) auf. Nach einigen weiteren Sekunden hängt das Tier plötzlich bewußtlos in den Riemen des Gestells, wobei sich tonische Krämpfe der gesamten willkürlichen Muskulatur einstellen; gleichzeitig sistiert auch die Atmung in der äußersten Exspirationsphase. Das Herz arbeitet kaum wahrnehmbar. Der Puls ist nicht mehr zu fühlen. Die Kornealreflexe fehlen. In solch extremem Zustande befindet sich das Tier bei künstlich auszuführender Atmung ungefähr 5 bis 6 Minuten. Dann erholt es sich auffallend rasch; nach weiteren 3 bis 5 Minuten scheinen seine Kräfte und sein Wohlbefinden sichtbar vollständig zurückzukehren. Nach dem Verschwinden der akuten Vergiftungssymptome, als sich das Tier schon ziemlich beruhigt hatte, waren jedoch noch während etwa 1½ Stunden eine ganze Reihe von verschiedenen Erscheinungen zu beobachten, nämlich eine sehr beträchtliche Beschleunigung des Pulses unter Verminderung seiner Spannung, eine anhaltend gesteigerte motorische Tätigkeit des Magendarmkanals sowie eine sich noch weiter verstärkende Salivation. Außerdem kam in dieser Zeit auch die excitosekretorische Wirkung des Cholins auf andere Verdauungsdrüsen zum Vorschein. Bereits nach einer latenten Periode von etwa 5 Minuten schieden sich neben dem in großer Menge aus der Magenfistel herausfließenden Speichel auch plötzlich mehrere Kubikzentimeter Galle ab; gleichzeitig zeigte die Magenschleimhaut stellenweise eine saure Reaktion (positiv auf Kongo) und erschienen erste Tropfen des Darmsaftes in den Darmfistelöffnungen. Das Maximum sowohl der Darm- als auch der Magensekretion wurde während 15 bis 20 Minuten nach erfolgter Injektion, als das Tier sich von der akuten Vergiftung eben erholt hatte, beobachtet. Im ganzen wurden 7,1 ccm Darmsaft und 19 ccm Magensaft (Gesamtacidität = 40; HCl = 0) ausgeschieden. Die Darmsekretion dauerte 90, die Magensekretion 45 Minuten. Während dieser Zeit konnte man auch eine erhöhte Salivation sowie häufige Bewegungen der in die Haut eingenähten Darmteile nebst Knurren in der Bauchtiefe wahrnehmen.

Weitere, unter Anwendung von geringeren Cholingaben angestellte Versuche haben erwiesen, daß das eben beschriebene Wirkungsbild im großen ganzen für das Cholin als typisch anzusehen ist. Einzelne Erscheinungen waren auch hier die gleichen, nur der Dosisgröße gemäß nicht so scharf ausgeprägt. Das Cholinchlorid in Gaben 0,36 bis 0,14 g = 22,3 bis 8,7 mg freier Base pro Kilogramm Gewicht, direkt in die Blutbahn eingeführt, war nämlich imstande, Dyspnoe, charakteristische Pulsveränderungen (anfangs Verlangsamung bei erhöhter, später Beschleunigung bei verminderter Spannung), stets ziemlich starke Salivation, geringe Magensekretion (10 bis 30 ccm von geringer Acidität) und fast regelmäßig auch Gallenabsonderung auszulösen. Die Magen-

Versuch 9.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins 18,6 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
3h00'	—	Schleim alkalisch	95 — 105	Beginn der Beobachtung
3 45	0			
4 00	0,2			
5 00	0			
5 15	1,2			
6 25	0			
6h25–26'	0		95–50 durus	*Injektion: 0,3 g salzsaures Cholin*, intravenös, im Laufe von etwa 60 Sek. (4,5 proz. Lösung)
6h26'	0		95 durus	Dyspnoe, Erbrechensbewegungen, Muskelzittern, Speichelfluß, Tränenabsonder., Knurren in d. Gedärmen
6 30	0	etwa 1,0 g Galle	150 „	
6 33	↗	↗ HCl +	150 mollis	Beleckt sich häufig
6 45	2,0	18,0 Gesamtacidität = 82, HCl = 60	110 „	
7 00	0	2,0	110 „	
7 15	0	1,0	110 normal gespannt	
7 30	0	Schleim alkalisch	110	
8 00	0		100	
8 15	0,7		95	
8 30	0		95	

Versuch 10.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags. Angewandte Dosen des Cholins 11,2 und 22,3 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
3h00'	—	Schleim alkalisch	95 — 85	Beginn der Beobachtung
4 30	0			
4 45	1,8			
5 00	0			
5h10–12'	0		90–50 durus	*Injektion: 0,18 g salzsaures Cholin*, intravenös, im Laufe von etwa 2 Min. (7,2 proz. Lösung)
5h11'	0	—	80 durus	Dyspnoe, Erbrechensbewegungen, Speichelfl., Knurren in d. Gedärmen
5 12	0	—	95 „	
5 15	0	↗	110 „	Beleckt sich häufig
5 30	↗	9,0 Gesamtacidität = 22, HCl = 6	120 mollis	
5h35–38'	+	+ Gesamtacidität = 76, HCl = 48	120–80 durus	*Injektion: 0,35 g salzsaures Cholin*, intravenös, im Laufe von etwa 3 Min. (7,2 proz. Lösung)
5h36'	+	+	80 durus	Dyspnoe, Tränenabsonder., Speichelfl.
5 40	0,3	3,0	120 „	Stuhldrang, Knurren in den Gedärmen
5 45	0,4	2,0	135 mollis	Beleckt sich zeitweise
6 00	1,1	10,0	120 „	
6 15	0	4,0	120–100 mollis	
6 30	0	1,0	120–100	
6 45	0	0,5	120–100	
7 00	0	0,5	120–100	
7 15	0	Schleim alkalisch	110	
7 30	0		105	
7 45	0		90 normal gespannt	
8 00	0		85	

Versuch 11.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosen des Cholins 14,9 und 11,2 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darm-saftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
12h45				Beginn der Beobachtung
1 15	0			
1 30	1,1			
1 45	0,5			
2 15	0	Schleim alkalisch	90 — 105	
2 30	0,7			
2 45	0,5			
3 45	0			
4 00	1,3			
4 25	0			
4 25	—	—	95 — 50	*Injektion: 0,24 g salzsaures Cholin,* intravenös, im Laufe von 20 Sek. (5 proz. Lösung)
4 26	0	—	60-70 durus	Dyspnoe
4 27	0	—	95 „	Speichelfluß — Beleckt sich häufig. Knurren in den Gedärmen, Muskelzittern
4 29	↗	4,0 Galle; HCl +	110 „	
4 35	1,3	9,0 (viel Galle) Gesamtacidität = 10 HCl = 0	130 mollis	
4 45	0,2	11,0 (Galle fehlt) (Gesamtacidität = 72; HCl = 42)	110 „	
4 52	0	+	110-85 durus	*Injektion: 0,18 g salzsaures Cholin,* intravenös, im Laufe von 10 Sek. (5 proz. Lösung)
4 53	0	+	90 „	Dyspnoe, Speichelfluß
4 55	0	+	150 mollis	
4 57	↗	0,5 (Galle)	150 „	Beleckt sich häufig, Knurren in den Gedärmen, Muskelzittern
5 00	0,9	4,0	135 „	
5 15	0	2,0	125 „	
5 30	0	2,0	120 normal gespannt	
5 45	0	1,0	110	
6 00	0	0,5	110	
6 15	0	Schleim alkalisch	110	
6 30	1,4		100	
7 00	0		110	

darmkanalbewegungen wurden ebenfalls merklich gesteigert. Bei größeren Gaben und insbesondere bei etwas schneller erfolgter Injektion traten gewöhnlich Erbrechensbewegungen (bei leerem Magen) auf. Vermißt werden bei diesen mittelgroßen Gaben nur die akuten Vergiftungserscheinungen, wie Bewußtlosigkeit, Atmungsstillstand und Muskelkrämpfe. Was nun aber die Darmsekretion anbelangt, so erzeugte bei geöffneter Magenfistel die intravenöse Cholinapplikation auch in diesen Versuchen eine ziemlich schwache, aber immerhin deutlich

Versuch 12.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins 12,4 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsattes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
3h00'	—	Schleim alkalisch	105	Beginn der Beobachtung
3 45	0		100	
4 00	1,6		110	
5 15	0		95	
5 30	1,6		110	
5h39–41'	0	—	110–45 durus	*Injektion: 0,2 g salzsaures Cholin,* intravenös, im Laufe von 2 Min. (2 proz. Lösung in 0.4 proz. NaCl)
5h40'	0	—	70 „	Dyspnoe, Speichelfluß, Schleim- und Tränenabsonderung
5 42	0	—	110 „	Erbrechensbewegungen (2 m)
5 45	↗	↗	145 „	Beleckt sich häufig. Knurren in den Gedärmen
5 50	1,2	5,0 (+ Galle) — Gesamtacidität = 42; HCl = 24	120 normal	
6 00	1,0	20,0 (Galle fehlt)	120 mollis	
6 15	0	2,0	120 „	
6 30	0	0,5	105 — normal gespannt	
6 45	0	0,5	95	
6 52	0	Schleim alkalisch	95	*Injektion: 10 ccm Aqua bidestillata,* intravenös
7 00	0		95	
7 15	0		95	
7 30	1,3		95	
8 00	0		95	

Versuch 13.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosen des Cholins 8,4 und 4,2 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsattes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
9h30'	—	Schleim alkalisch	80—85	Beginn der Beobachtung
12 00	0			
12 15	1,3			
12 30	1,0			
12 45	0,7			
1 00	0,2			
1h04–06'	0		95—70	*Injektion: 0,135 g salzsaures Cholin,* intravenös, im Laufe von etwa 2 Min. (2,25 proz. Lösung)
1h05'	0		110 durus	Dyspnoe, Speichel- und Tränenfluß

Versuch 13 (Fortsetzung).

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm		Puls	Bemerkungen
1 07	0	Schleim alkalisch		54 durus	Erbrechensbewegungen
1 08	↗	↗		100 „	Erbrechensbewegungen
1 15	2,1	7,0 (+ Galle)	Ges.-Acid. = 28 freie HCl = 10	105 norm.	Speichelfluß, Knurren in den Gedärmen
1 30	1,1	12,0 (Galle fehlt)	Ges.-Acid. = 28 freie HCl = 10	90 „	Speichelfluß, Knurren in den Gedärmen
1 45	0,3	6,0	Ges.-Acid. = 28 freie HCl = 10	90 „	Beleckt sich häufig
2 00	0,3	1,0	Ges.-Acid. = 28 freie HCl = 10	85 „	Beleckt sich häufig
2 15	0	Schleim alkalisch		85 „	Beleckt sich häufig
2h23–25′	0	Schleim alkalisch		85	*Injektion: 0,087 g salzsaures Cholin.* intravenös, im Laufe von etwa 2 Min. (2,25 proz. Lösung)
2h24′	0	Schleim alkalisch		85–150 mollis	Dyspnoe, Speichelfluß
2 25	0	Schleim alkalisch		60 durus	Dyspnoe, Speichelfluß
2 26	↗	Schleim alkalisch		85 normal gespannt	
2 30	0,5	Schleimh. sauer		85 normal gespannt	
2 45	1,4	Schleimhaut alkalisch		85 normal gespannt	
3 00	0,6	Schleimhaut alkalisch		85 normal gespannt	
3 15	0,4	Schleimhaut alkalisch		85 normal gespannt	
3 30	0	Schleimhaut alkalisch		85 normal gespannt	
3 45	0	Schleimhaut alkalisch		85 normal gespannt	
4 00	0,9	Schleimhaut alkalisch		85 normal gespannt	

erhöhte Absonderung des Darmsaftes aus der *Thiry-Vella*schen Fistel, was man am besten aus der Tabelle I ersieht.

Tabelle I.

Nr. des Versuchs	Dosis des Cholinchlorids g	Injektion fiel gegen Ende der Ruhepause	Dauer der latenten Periode Min.	Sekretionsdauer Min.	Totalmenge des abgeschiedenen Darmsaftes g	Durchschnittl. während der einzelnen Tätigkeitsperioden abgeschiedene Darmsaftmenge ccm	Wert der durch Cholin erzeugten Darmsekretion bzw. Darmsekretionssteigerung ccm	Verhältnis des bewirkten Darmsekretionswertes zur Größe der Cholindosis
8	0,6	+	5	70	7,1	1,5	5,6	9,33
9	0,3	+	8	12	2,0	1,0	1,0	3,33
10	0,18 + 0,36	—	20	30	1,8	—	1,8	3,33
11	0,24	—	4	16	1,5	—	1,5	6,25
11	0,18	?	5	3	0,9	—	0,9	5,00
12	0,2	+	5	15	2,2	1,5	0,7	3,50
13	0,135	+	4	50	3,8	3,2	0,6	4,44

In der Regel entfaltete sich die Darmsekretion einigermaßen parallel den anderen Wirkungserscheinungen, in erster Linie der Speichel- und Magensekretion und den Magendarmkanalbewegungen. In der Mehrzahl

dieser Versuche konnte man eine sehr klar ausgeprägte latente Periode von 4 bis 5 Minuten, welche für Darm- sowie Magensekretion gültig war, beobachten. Die Darmsaftabsonderung erfolgte sozusagen stoßweise, wobei die Hauptmenge des Darmsaftes gewöhnlich schon während der wenigen ersten Minuten nach Sekretionsbeginn ausgeschieden wurde. Die Gesamtmenge des nach Cholineinverleibung (bei einer Länge des isolierten Darmabschnittes von 30 cm) gewonnenen Darmsaftes war bei Gaben von 26 bis 10 mg pro Kilogramm Gewicht intravenös eine ziemlich geringe (3,6 bis 0,9 ccm). In einigen Versuchen fiel die Cholininjektion zwischen die einzelnen Tätigkeitsperioden, etwa in die Mitte der Ruhepause (vgl. Versuche 10 und 11); demgemäß müssen wir die gesamte hier beobachtete Sekretion als Folge der Cholineinwirkung auf den Sekretionsapparat betrachten. In anderen Fällen (vgl. Versuche 9, 12 und 13) dagegen, wo das Cholin sichtbar gegen Ende der Ruhepause, unmittelbar vor der fälligen Tätigkeitsperiode ins Blut eingeführt wurde, schieden sich, bei sonst gleichen Versuchsbedingungen, bedeutend größere Mengen des Darmsaftes ab. Dieses erscheint verständlicherweise als ein Endresultat der kombinierten Einwirkung auf den Sekretionsapparat einerseits des einverleibten Cholins und andererseits derjenigen endogenen Reize, welche überhaupt der „periodischen" Tätigkeit der Verdauungsdrüsen zugrunde liegen. Wollen wir nun auch in diesem letzten Falle die exzitosekretorische Cholinwirkung quantitativ auswerten, so dürfte als Maß für dieselbe die Differenz zwischen der nach Cholineinverleibung erhaltenen Darmsaftmenge und einer durchschnittlichen die spontane „periodische" Sekretion während einer Tätigkeitsperiode desselben Tages ausdrückenden Größe dienen. Diese Erwägungen sind auch einigen Abteilungen der hier gegebenen Tabelle zugrunde gelegt worden, welche zu der Schlußfolgerung zu berechtigen scheint, daß die Steigerung der Darmsekretion im unter Schonung der Mesenterialnerven isolierten Darmteile der Größe der einverleibten Gabe des Cholins, falls man dasselbe intravenös injiziert, annähernd proportional ist.

Nur ein einziger Versuch ergab eine bedeutende Abweichung von dieser Gesetzmäßigkeit (vgl. Versuch 8). Hier fiel die nach der intravenösen Injektion von 0,6 g Cholinchlorid erfolgte Darmsekretion, auf eine Einheit des Cholins (1 g) bezogen, bedeutend stärker aus, als in allen anderen Versuchen. Da aber gerade in diesem Falle die allgemeine Wirkung recht toxisch war, wobei, was insbesondere auffiel, die gesamte willkürliche Muskulatur sich ziemlich lange in tonischen Krämpfen befand, könnte man annehmen, daß diese ungewöhnlich starke Darmsekretion in gewissem Umfange eine sekundär bewirkte Erscheinung sei. Wie wir weiter unten noch sehen werden, besitzen wir in unserem Versuchsmaterial einige Angaben, welche dieses unter anderem auch als Folge der gesteigerten Abgabe der verschiedenen sekretionserregenden Hormone ins Blut insbesondere seitens des Muskelgewebes betrachten lassen.

Versuch 14.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 7 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins etwa 5 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
12h30′	—	Schleim alkalisch	85—95	
1 00	0			
1 15	0,5			
2 00	0			
2 15	1,8			
3 15	0			
3 30	2,0			
4 30	0			
4 45	1,0			
5 25	0			
5h26	0			*Injektion:* 0,08 g *salzsaures Cholin* intravenös (1proz. Lösung in 0,9proz. NaCl)
5 27	0		95 durus	Dyspnoe (schwach angedeutet) Beleckt sich häufig
5 28	0		120 durus	
5 30	0		100 normal gespannt	Knurren in den Gedärmen, beleckt sich zeitweise
5 35	↗	↗ HCl +	100	
5 45	1,9	1,0	100	
6 60	0	0,5		
6 15	0	Schleim alkalisch	85—95 normal gespannt	
6 30	0			
6 45	0,6			
7 15	0			
7 30	1,2			
8 00	0			

Ferner suchten wir die Größe der geringsten noch wirksamen Cholingaben zu ermitteln. Zu diesem Zwecke wurde eine Reihe von Versuchen angestellt, und zwar nicht nur am eben behandelten Hunde 4, sondern auch am in analoger Weise operierten, in unserer ersten Mitteilung als Hund 2 beschriebenen Tiere. In allen diesen Experimenten ergab sich eine vollkommene Übereinstimmung. Es sollen daher nur wenige von ihnen als Beispiel angeführt werden (vgl. Versuche 13, 14 und 15). Es erweist sich nämlich, daß das Cholin sogar in so winzigen Dosen, wie 5 bis 2 mg pro Kilogramm Gewicht, ins Blut eingeführt, imstande ist, ein noch wahrnehmbares Wirkungsbild hervorzurufen. Schon während der Injektion selbst konnte man auch hier eine Anzahl bedeutend tieferer und etwas schneller als gewöhnlich aufeinander folgender Inspirationen beobachten. Gleichzeitig trat auch eine deutliche Verlangsamung des Pulses unter Steigerung seiner Spannung auf, manchmal sogar auch Stillstand der Herztätigkeit für einige (5 bis 6)

Versuch 15.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosen des Cholins 5,6, 2,8 und 1,5 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
10h30'	—			
10 45	0			
11 00	1,8			
11 45	0		105—95	
12 00	2,2	Schleim alkalisch		
1 00	0			
1 15	1,2			
1h24'	0		110—50 durus	*Injektion: 0,09 g salzsaures Cholin,* intravenös (3 proz. Lösung)
			110 durus	
1 25	0		130 „	Speichelfluß
1 28	0,3	↗	110 mollis	Beleckt sich zeitweise
1 40	0	3,0 Ges.-Acid. = 80	95	
1 45	0	1,5 HCl = 64	95 normal gespannt	
2 00	0		95	
2 15	0	Schleim alkalisch		
2h21'	0		110—85	*Injektion: 0,045 g salzsaures Cholin,* intravenös (dieselbe Lösung)
2 23	0		110 mollis	Beleckt sich häufig
2 28	0,2	↗	95	
2 35	0,4	0,5 HCl +	95 normal gespannt	Beleckt sich nicht mehr
2 45	0,5	0,5	95	
3 00	0		95	
3 15	0		95	
3 30	0,4	Schleimhaut alkalisch	95	
3h41'	0		95—100	*Injektion: 0,03 g salzsaures Cholin,* intravenös (dieselbe Lösung)
3 42	0		70—95	
3 46	0,1	Schleimhaut sauer	95	
3 47	0		120	
3 48	0		110	Beleckt sich zeitweise
3 55	0	Schleimhaut alkalisch	110	
4 00	0		110	
4 15	0			Beleckt sich nicht
4 30	0,8	Schleim alkalisch		
5 15	0		100—95	
5 30	1,8			

Sekunden. Die Atmung kehrt schon nach 30 bis 60 Sekunden zur Norm zurück. Der Puls erfährt nach der anfänglichen 30 bis 60 Sekunden währenden Verlangsamung (bis 30 Schläge in der Minute) eine Beschleunigung (bis 120 in der Minute) für die Dauer von 2 bis 5 Minuten, um danach ebenfalls auf die Norm (80 bis 90 in der Minute) zurückzugehen. Gegen Ende der Injektion beginnt der Hund, sich häufig zu belecken; aus der Magenfistel fließen größere Speichelmengen als gewöhnlich ab. Nach einer latenten Periode von 5 Minuten zeigt die Magenschleimhaut eine saure Reaktion. Bei etwas höheren Cholin-

gaben sezernieren sich auch wenige Kubikzentimeter (1 bis 7) Magensaft von sehr geringer Acidität (etwa 10) während weiterer 2 bis 17 Minuten.

Die fördernde Wirkung des Cholins auf die Darmsekretion ist, wie wir festgestellt haben, selbst bei Anwendung toxischer Dosen eine ziemlich schwache. Nichtsdestoweniger gelingt es, eine solche in der Mehrzahl der betreffenden Versuche auch bei intravenös applizierten Gaben von nur 2 bis 1½ mg pro Kilogramm Gewicht doch wahrzunehmen. Eine Umrechnung des erzielten Sekretionswertes auf die einverleibte Dosis ergibt auch in diesen Fällen ungefähr denselben Koeffizienten, wie bei Anwendung größerer Cholingaben (vgl. Tabelle II).

Tabelle 11.

Nr. des Versuchs	Dosis des Cholinchlorids g	Injektion fiel gegen Ende der Ruhepause	Dauer der latenten Periode Min.	Sekretionsdauer Min.	Totalmenge des abgeschiedenen Darmsaftes g	Durchschnittl. während der einzelnen Tätigkeitsperioden abgeschiedene Darmsaftmenge ccm	Wert der durch Cholin erzeugten Darmsekretion bzw. Darmsekretionssteigerung ccm	Verhältnis des bewirkten Darmsekretionswertes zur Größe der Cholindosis
14	0,08	+	9	10	1,5	1,2	0,3	3,75
15	0,09	—	5	1	0,3	} 1,45	0,3	3,33
15	0,045	+	7	17	1,1		?	?
15	0,03	—	5	1	0,1		0,1	3,33

Was eigentlich die Größe der noch auf die Darmsekretion wirkenden Minimaldosis anbelangt, so schwankt dieselbe innerhalb ziemlich weiter Grenzen. So war z. B. in einem Falle sogar eine Gabe von 9 mg pro Kilogramm Gewicht noch unwirksam, während in einigen anderen schon 2 mg bei sonst augenscheinlich gleichen Versuchsbedingungen darmsekretionserregend wirkte. Ziehen wir jedoch die Gesamtheit des uns vorliegenden experimentellen Materials in Erwägung, so müssen wir im allgemeinen 2 mg freier Base pro Kilogramm Gewicht als Schwellendosis annehmen; in dieser Menge vermag nämlich das Cholin in einer bedeutenden Anzahl von Versuchen, obwohl nur kaum wahrnehmbar, so doch immerhin ganz unzweifelhafte Andeutungen aller typischen, oben schon eingehend geschilderten Wirkungserscheinungen hervorzurufen, darunter auch Erregung der Darmsekretion.

Nach den Untersuchungen von *Guggenheim* und *Löffler* (16) schwankt der Cholingehalt des Blutes normalerweise zwischen 0,002 und 0,02 g pro Mille. Führt man nun einem Hunde von 14 kg Gewicht, wie bei den in Rede stehenden Versuchen, 0,02 bis 0,03 g Cholin intravenös ein, so macht dieses nur eine Vergrößerung des dem Blute eines solchen Hundes normal eigenen Cholingehaltes etwa um das Zwei- bis Dreifache aus. (Ein Hund von 14 kg Gewicht besitzt etwa 1 kg Blut, welches

lso durchschnittlich 0,01 g Cholin enthalten dürfte.) Hieraus ist zu ersehen, daß schon die größten normalerweise im Blute vorhandenen Cholinmengen unter Umständen eine Darmsekretion auszulösen imstande wären, oder zum mindesten sich den bereits wirksamen Schwellenmengen stark nähern.

Aus allen oben angeführten Versuchen ist somit die Schlußfolgerung zu ziehen, daß dem Cholin innerhalb seiner mannigfaltigen Wirkungen im Organismus auch die Fähigkeit eignet, unter gewissen Bedingungen die sekretorische Tätigkeit der Darmdrüsen zu erregen.

Bekanntlich soll zurzeit die Zugehörigkeit des Cholins zur Reihe der parasympathisch fördernden Substanzen als anerkannte Tatsache betrachtet werden. Es finden sich jedoch in der Literatur einige Hinweise darauf, daß die physiologischen Wirkungen des Cholins sich nicht nur innerhalb dieses Rahmens abspielen. So äußert sich z. B. nach *Golowinski* (17) die Cholinwirkung auf das Herz der Warmblütigen „in Erregung verschiedener sogenannter intrazentraler Zentren — nicht nur der hemmenden, sondern auch der verstärkenden und beschleunigenden“. Selbst wenn man die Cholinwirkung als auf die Erregung des parasympathischen Nervensystems beschränkt annimmt, ist andererseits die Innervation der Darmdrüse und speziell die Rolle der verschiedenen Elemente des parasympathischen Nervensystems als bis jetzt noch durchaus nicht genügend aufgeklärt anzusehen. Es müssen hier in dieser Beziehung die Untersuchungen von *Sawitsch* (18) erwähnt werden, nach welchen durch das Vagussystem wie sekretionserregende, so auch sekretionshemmende Impulse zu den Darmdrüsen hindurchgeleitet werden können. Es besteht also nur auf dem Wege direkter Experimente die Möglichkeit, zur Lösung der Frage nach dem Angriffspunkt des Cholins bei seiner exzitosekretorischen Wirkung auf den Darmdrüsenapparat beizutragen.

Zu diesem Zwecke prüften wir zunächst, ob das Cholin irgend eine Wirkung auf die sekretorische Tätigkeit der Drüsen eines unter Ausschaltung möglichst aller zu demselben verlaufenden mesenterialen Nerven isolierten Darmteiles auszuüben vermag.

Als Untersuchungsobjekt diente uns

Hund 5. Junge Hündin von 10 kg Gewicht. Am 11. April 1924 wurde ein etwa 10 cm langer und 40 bis 50 cm analwärts von der Plica duodenojejunalis gelegener Darmteil nach *Thiry* isoliert, indem auch alle zu demselben gehörigen mesenterialen Nerven nach der Methode von *Bickel* durchtrennt wurden. Am 19. Februar 1925 wurde eine 18 mm breite Metallkanüle in den Fundusteil des Magens eingenäht.

Die Drüsen des derart losgetrennten Darmabschnittes wiesen anfänglich sehr heftige kontinuierliche Sekretion (bis 4,2 ccm pro Stunde) auf. Während weniger Tage aber nahm dieselbe in ihrer Intensität bedeutend ab, so daß zur Zeit, als die in Rede stehenden Versuche vorgenommen wurden, während 12stündiger Beobachtungsdauer bei leerem Magen sich nur etwa 1,5 bis 2,0 ccm Darmsaft abschieden. Hierbei zeigte diese Sekretion einen, wenn auch nicht be-

sonders regulären, so doch im großen ganzen deutlich genug wahrnehn baren periodischen Charakter. Während jeder einzelnen Tätigkeit periode von je 10 bis 20 Minuten Dauer sezernierten etwa 0,4 bis 0, am häufigsten 0,6 ccm Darmsaft. Die einzelnen Sekretionsperiode wurden voneinander durch Ruhepausen von 2 bis 4 Stunden getrenn Demgemäß erscheinen die Drüsen dieses „nervenlosen“ Darmes einige inneren, im Organismus selbst periodisch entstehenden Reizen gege über als noch zweifellos erregbar. Was aber ihre Erregbarkeit de Cholin gegenüber anbelangt, so zeigen unsere Versuche ganz deutlic daß die Ausschaltung der Einflüsse seitens des extraintestinalen Nerve systems eine Änderung des Verhaltens der Darmdrüsen zum Choli nach sich zieht. Wenn nämlich das Cholin in mittelgroßen, sogar i stark toxisch wirkenden Gaben intravenös eingeführt wird, weisen di Drüsen des „nervenlosen“ Darmes keine Sekretion auf, und diese sowohl bei geschlossener Magenkanüle als auch in dem Falle, wen der unter dem Cholineinfluß sich sezernierende Magensaft bei geöffnete Kanüle die Möglichkeit besitzt, gänzlich abzufließen. Im übrige zeigte dieser Hund aber das ganz typische Wirkungsbild, welches sons in allen Einzelheiten mit den an anderen Hunden auftretenden und bereits ausführlich beschriebenen Erscheinungen vollkommen über- einstimmt.

Versuch 16.

Hund 5 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 10 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins etwa 26 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
3h00′	—			
3 45	0	Schleim		
4 00	0,6	alkalisch	90—95	
4 45	0			
5 00	0,6			
5 25	0	—	95—50	*Injektion: 0,3 g salzsaures Cholin*, intra venös, im Laufe von 30 Sek. (5 pro Lösung)
5 26	0	viel Speichel	?	Dyspnoe, Speichel- und Tränenfl Erbrechensbewegungen
5 27	0	„ „	> 200	Krämpfe, Atmungsstillstand, Bewuß losigkeit, konjunktivale Reflexe fe len, künstliche Atmung
5 30	↗	↗; (3,0 Galle)	150	
5 45	0,5	12,0 AGes.-acid = 36	130—120	Munter, beleckt sich häufig, Knurr in den Gedärmen
6 00	0,1	5,0 HCl = 16	130—120	
6 15	0,1	2,0 alkalisch	100	
6 30	0,1		95	
6 45	0,1	Schleim	95	
7 00	0,1	alkalisch	95	
8 00	0		95	

Versuch 17.

Hund 5 („Nervenlose“ Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 10 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 7 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins etwa 12 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
3h00'	—	Schleim alkalisch	80—85	Beginn der Beobachtung
4 30	0			
4 45	0,6			
5 00	0,3			
6 00	0			
6h14-15'	—	—	80—35	*Injektion: 0,14 g salzsaures Cholin,* intravenös, im Laufe von 60 Sek. (2 proz. Lösung in 0,4 proz. NaCl)
6h15'	0	viel Speichel	110	Dyspnoe, Speichelfluß
6 19	0	HCl +, viel Speichel, ↗ Galle	80	Knurren in den Gedärmen, Stuhldrang
6 25	0	viel Speichel, Galle 3,0	80	Beleckt sich häufig
6 30	0	10,0 } Gesamtacidität = 48, HCl = 30	80	Beleckt sich selten
6 45	0	1,0	80	
7 00	0	1,0	80	
7 05	0	Schleim alkalisch	80	Beleckt sich nicht mehr
7 30	0		80	
7 45	0,6		80	
8 00	0		80	

Versuch 18.

Hund 5 („Nervenlose“ Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 10 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins 8,7 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
9h30'	—	—	80—85	Beginn der Beobachtung
11 00	0	—		
11 15	1,0	—		
11 45	0	—		
12 00	0,5	Schleim alkalisch		
1 00	0			
1 15	0,8			
1h31-33'	0		85—60	*Injektion: 0,1 g salzsaures Cholin,* intravenös, im Laufe von etwa 3 Min. (2,25 proz. Lösung)
1h32'	0	viel Speichel	140	Dyspnoe, Speichel- und Tränenfluß
1 35	0,2		110	Knurren in den Gedärmen } beleckt sich zeitweise
1 38	0	HCl +, Galle ca. 2,0	110	
1 45	0	3,0 } (Galle fehlt) Ges.-Acid = 26 HCl = 6	90	
2 00	0	3,0	85	
2 15	0	2,0	85	Knurren in den Gedärmen
2 30	0,3	Schleim alkalisch	85	
2 45	0		85	
3 00	0,7		85	
4 15	0		85	

Versuch 19.

Hund 5 („Nervenlose" Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 10 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins 15,6 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
12h15'	—		Beginn der Beobachtung. Magenfistel geschlossen
1 00	0		
1 15	0,2		
1 45	0	80—90	
2 00	0,3		
2 15	0,3		
2 30	0,1		
2 45	0,6		
5 00	0		
5h06–07'	0	?	*Injektion: 0,18 g salzsaures Cholin,* intravenös (3proz. Lösung). Dyspnoe, Speichelfluß
5h08'	0	130—120	Erbrechensbewegungen } Beleckt sich häufig
5 11	0	120	Knurren in den Gedärmen } Beleckt sich häufig
5 15	0	100	
5 20	0	85	
6 45	0	85	
7 00	0,4	85—90	
8 00	0		

Versuch 20.

Hund 5 („Nervenlose" Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 10 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins etwa 4,9 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
2h15'	—		Beginn der Beobachtung. Magenfiste geschlossen
2 30	0,2		
2 45	0,3		
3 15	0		
3 30	0,3	70—80	
3 45	0,3		
4 30	0		
4 45	0,9		
5 00	0,3		
5 45	0		
5 49	0	80— 60	*Injektion: 0,056 g salzsaures Cholin,* intravenös (2,8 proz. Lösung)
5 50	0	90—110	Vertiefung der Atmung, beleckt sich häufig
6 00	0	70	
6 15	0	70	
6 30	0,2	70	
7 15	0	70	
7 30	0,7	70	
8 00	0	70	

Versuch 21.

Hund 5 („Nervenlose“ Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 10 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags. Angewandte Dosen des Cholins 15,6, 39 und 47,8 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
10h00'	—		85—90	Beginn der Beobachtung
4 00	1,2	Schleimh. sauer		
5 00	0	„ alkal.		
5 05	0,4	„ „		
5 06	0	„ „	95	*Injektion: 0,18 g salzsaures Cholin*, subkutan (7,5 proz. Lösung)
5 10	0	„ sauer	95	
5 25	0	6,0 (Gesamtacidität = 64, HCl = 52)	95	*Injektion: 0,46 g salzsaures Cholin*, subkutan (dieselbe Lösung)
5 30	0	—	90	Beleckt sich häufig
5 45	0	12,0	95	
5 55	0	—	?	*Injektion: 0,55 g salzsaures Cholin*, subkutan (dieselbe Lösung)
6 00	0	16,0	105	Beleckt sich häufig. Knurren in den Gedärmen, zeitweise Stuhlgang
6 15	0	14,0	100	
6 30	0	25,0	100	
6 45	0	15,0	100	
7 00	0	6,0 (Gesamtacidität = 32, HCl = 20)	100	Schläft
7 15	0	5,0	100	
7 30	0	5,0		
7 45	0	4,0 (freie HCl +)	95	
8 00	0	2,0		
8 15	0	1,0		

Versuch 22.

Hund 5 („Nervenlose“ Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 10 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Cholins 20,8 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
10h30'	—	—	75—80	Beginn der Beobachtung
11 15	0	—		
11 30	0,4	Schleimhaut alkalisch		
1 00	0			
1 15	0,5			
2 00	0			
2 15	0,3			
2 40	0			*Injektion: 0,24 g salzsaures Cholin*, subkutan (3 proz. Lösung)
2 50	0	Schleimh. sauer	85	
3 15	0	1,0 (Ges.-Acid. = 10)	85	
3 30	0	Schleimhaut alkalisch	85	
3 45	0,6		85	
6 00	0		80—75	

Einigen Experimenten dieser Versuchsreihe, in welchen wir das Cholin unter die Haut einführten, soll in bezug auf das Bild der Allgemeinwirkung eine gewisse Sonderstellung zugewiesen werden. Im Gegensatz zu den Fällen, wo das Cholin intravenös appliziert wurde, vermochte es bei sub-

kutaner Injektion sogar in Gaben von mehr als 1,0 g keine sichtbaren Veränderungen weder der Atmung, noch der Blutzirkulation zu bewirken; das gleiche war in analogen Versuchen auch an anderen Hunden zu beobachten. Als einzig deutlich zum Vorschein kommendes Symptom konnte eine ziemlich beträchtliche Magensekretion wahrgenommen werden, zu welcher lediglich noch eine schwach angedeutete Salivationsverstärkung und eine merklich gegen die Norm gesteigerte Motilität des Magendarmkanals traten. Eine Darmsekretion fehlte auch hier.

An diesem Hunde konnten wir nur einmal eine Sekretionssteigerung im „nervenlosen" Darmabschnitt beobachten, und zwar in Versuch 16, wo das Cholin in einer Menge von 26 mg pro Kilogramm Gewicht während etwa 30 Sekunden in die Vena jugularis ext. injiziert worden war. Diese Gabe erwies sich im gegebenen Falle als subletal. Das in Erscheinung tretende Wirkungs- oder richtiger Vergiftungsbild war vollkommen dasselbe wie in dem oben beschriebenen Versuch 8. Es traten nämlich starke Störungen des Blutkreislaufs, Speichelfluß und erhöhte Tränen- und Schleimabsonderung auf. Sehr bald stellten sich auch hier Erbrechensbewegungen und unmittelbar nachher Atmungsstillstand und Muskelkrämpfe, sowie unter Hemmung der Reflexe auch Bewußtlosigkeit ein. Zur Lebensrettung des Tieres waren wir genötigt, künstliche Atmung einzuleiten. Sobald sich nach Ablauf von einigen (5 bis 6) Minuten das Tier erholt hatte, traten Magensekretion, Gallenabsonderung, Steigerung der Darmmotilität und auch eine für diesen Hund ziemlich bedeutende Darmsekretion auf. Wir haben natürlich keinen Grund, die letztere als Folge der direkten Einwirkung des Cholins auf die Drüsen des „nervenlosen" Darmteils zu betrachten, da alle übrigen an diesem Hunde angestellten Versuche in dieser Beziehung durchweg negative Resultate zeigten. Von irgendwelchen sekundären Einflüssen auf die Drüsenzellen seitens des extraintestinalen Nervensystems, welches ja auf operativem Wege ausgeschaltet worden war, kann ebenfalls keine Rede sein. Daher kommen zwangsläufig nur hormonale, durch Cholineinverleibung sekundär ausgelöste Einwirkungen in Betracht. Es scheint uns über allen Zweifel erhaben, daß hier gerade die aus den heftig arbeitenden Muskeln in gesteigerter Menge ins Blut gelangenden Hormone eine ausschlagende Rolle spielen müssen. In der Tat kennen wir unter den Muskelhormonen solche, die, wie z. B. das Carnosin (15) in unseren früher mitgeteilten Versuchen, die Drüsen des nervenlosen Darmes stark zu erregen vermögen. Andererseits ist es ja auch schon experimentell nachgewiesen, daß das in Tätigkeit versetzte Muskelgewebe einige physiologisch wirksame Stoffe in gesteigertem Maße ins Blut abgibt [*Brinkman* und *Ruiter* (19)]. Durch das Mitspielen derartiger Agenzien scheint, wie schon angegeben, auch die ungewöhnlich starke Steigerung der Darmsekretion, welche wir nach Injektion einer subletalen Dosis am Hunde 4 beobachten konnten (Versuch 8), bedingt worden zu sein.

Aus dieser Versuchsreihe ersehen wir also, daß eine direkte Wirkung des Cholins auf die Darmsekretion nach Ausschaltung des extraintestinalen Nervensystems nicht mehr feststellbar ist.

Hierher gehören gewissermaßen auch unsere Beobachtungen über die Wirkung des Cholins bei völlig atropinisierten Tieren (vgl. Versuch 29). Wenn man zuerst eine verhältnismäßig große Dosis Atropin (0,5 mg pro Kilogramm Gewicht) subkutan injiziert, und sodann auf

der Höhe seiner Wirkung etwa 15 mg pro Kilogramm Gewicht Cholin intravenös einführt, so kann in diesem Falle keine Absonderung von Darmsaft beobachtet werden, während die gleiche Cholingabe sonst bei demselben Hunde stets Darmsekretion erregte. Somit hebt das Atropin die exzitosekretorische Wirkung des Cholins auf die Darmdrüsen vollständig auf. Die Magenschleimhaut zeigte dagegen auch hier stellenweise für kurze Zeit eine schwach saure Reaktion. Die allgemeine Toxität des Cholins wird durch das Atropin bedeutend erhöht. Selbst eine Cholingabe von 0,2 g intravenös, welche sonst keine allzu starke toxische Wirkung auszulösen vermag, bewirkt in diesem Falle bereits sehr bedrohliche Dyspnoe (beinahe Atmungsstillstand), sowie starke Störungen der Blutzirkulation (Verschwinden des Pulses) und der Tätigkeit des Zentralnervensystems (Hemmung aller Reflexe). Aus der Gesamtheit unserer Versuche ist also zu entnehmen, daß das Wesen der fördernden Wirkung des Cholins auf die Darmsekretion allem Anschein nach in primärer Erregung des Parasympathicus, und zwar derjenigen Elemente desselben, welche nach operativer Durchtrennung der Mesenterialnerven physiologisch gänzlich ausgeschaltet werden.

Neuerdings wurde das Verhalten der Darmsekretion dem Acetylcholin gegenüber von *Mitsuda* (20) untersucht. Er konnte feststellen, daß mit fortschreitender Degeneration der intramuralen Nervenelemente die Darmsekretion auf Acetylcholin immer weniger, am 28. Tage nach der Durchtrennung der mesenterialen Nerven gar nicht mehr anspricht; daher nimmt er an, daß der Angriffspunkt des Acetylcholins der Parasympathicus in seinen intramuralen Endigungen ist.

Es scheint uns sehr möglich, daß das Cholin als solches ebenfalls gerade diese Elemente des Parasympathicus zu erregen imstande ist. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß im Mechanismus der Cholinwirkung auf die Darmsekretion neben der Erregung der peripheren Elemente des Parasympathicus auch eine solche seiner Kerne, insbesondere bei Anwendung etwas größerer Dosen von gewisser Bedeutung sein könnte. Diese Vermutung liegt um so näher, als das Cholin, wie in den Untersuchungen von *C. Schwarz* (21) nachgewiesen, tatsächlich die Eigenschaft besitzt, das Vaguszentrum zu erregen, was z. B. die Pankreassekretion in gewissem Maße beeinflußt. Nach dem Gesagten dürfte jedoch der intimere Mechanismus der erregenden Wirkung des Cholins auf die Darmsekretion durch die zurzeit vorliegenden Untersuchungen als noch immer nicht endgültig aufgeklärt betrachtet werden.

In unseren Versuchen hatten wir die Möglichkeit, auch den Einfluß des Cholins auf die Tätigkeit der Magendrüsen mit ziemlich großer Genauigkeit zu verfolgen. Wie schon oben erwähnt, löste das Cholin in Dosen von 37 bis 2 mg intravenös und von 100 bis 20 mg pro Kilo-

gramm Gewicht subkutan ganz regulär eine Magensekretion aus; dieselbe ist aber ihrem Werte nach nicht als eine bedeutende, sondern eher als eine ganz schwache zu bezeichnen. Von großem Interesse ist, daß die durch Cholin bewirkte Magendrüsenleistung von der gleichen Gesetzmäßigkeit beherrscht wird, wie die von uns oben für die Darmsekretion festgestellte. Verrechnet man nämlich die nach Cholininjektion von der Magenschleimhaut abgeschiedenen Salzsäuremengen auf die Einheit der einverleibten Substanz (= 1 g), so erhält man bei nicht zu weit auseinander liegenden Dosen meistens — natürlich im großen ganzen genommen — den gleichen Koeffizienten, wobei in dieser Beziehung die Einverleibungsart ohne irgendwelchen wahrnehmbaren Einfluß zu sein scheint (vgl. Tabelle III). Da ferner das Atropin die fördernde Wirkung des Cholins auf die Magensekretion praktisch vollkommen hemmt, so liegt derselben möglicherweise ebenfalls primäre Erregung des Parasympathicus zugrunde.

Tabelle III.

Nr. des Versuchs		Dosis des Cholinchlorids g		Dauer der latenten Periode Min.	Sekretionsdauer Min.	Ausscheidung aus der Magenfistel: Menge (ccm n/10 Lösung)	Acidität (ccm n/10 Lösung)	Totalmenge d. abgeschied. Salzsäure (ccm n/10 Lösung)	Verhältnis der Totalmenge der abgeschiedenen Salzsäure zur Größe d. Cholinchloriddosis
8	Hund 4	0,6	intravenös	5	60	19	40	760	1260
9	Hund 4	0,3	intravenös	8	42	21	82	1722	5740
10	Hund 4	0,18	intravenös	5	105	9	22	1794	3322
		+ 0,36				21	76		
11	Hund 4	0,24	intravenös	4	> 20	15	72	1080	4500
11	Hund 4	0,18	intravenös	5	63	10	72	720	4000
12	Hund 4	0,2	intravenös	6	60	28	42	1176	5580
13	Hund 4	0,135	intravenös	4	52	26	28	728	5400
16	Hund 5	0,3	intravenös	5	30	17	36	612	2040
17	Hund 5	0,14	intravenös	5	40	12	48	576	4114
18	Hund 5	0,1	intravenös	7	37	8	26	208	2080
21	Hund 5	1,2	subkutan	4	190	88	64	6144	5120
						16	32		

Lange Zeit wollte man bekanntlich dem Cholin keine andere physiologische Bedeutung außer der eines schädlichen Abfallprodukts des Zellenstoffwechsels zuerkennen. Den Wendepunkt hierin scheinen die interessanten Befunde von *Weiland* (22) und insbesondere von *Le Heux* bedeutet zu haben, durch welche die Rolle des Cholins im Mechanismus der Magendarmkanalbewegungen einigermaßen aufgeklärt wurde. *Le Heux* (23) ist der Ansicht, daß diese Verbindung normalerweise an der Erregung des Plexus myentericus beteiligt und daher als ein Hormon der Darmbewegungen zu betrachten ist. Übrigens sind auch Hinweise darauf zu finden, daß das Cholin erst in bereits toxischen Gaben die Darmmotilität steigert. In einigen Fällen, ziemlich häufig bei Menschen, soll sogar Herabsetzung derselben eintreten (24). *Le Heux* betont jedoch auch in einer seiner letzten

Veröffentlichungen, daß Cholingaben von 4 bis 10 mg intravenös, welche gut vertragen werden, bei Katzen eine starke Peristaltik des Magens und eine beträchtliche Verstärkung beider Bewegungsarten des Dünndarms (Pendelbewegung und Peristaltik) hervorrufen (25).

Auf Grund unserer Versuche können auch wir bestätigen, daß das Cholin unzweifelhaft die Magendarmmotilität fördert und dies sogar in so kleinen Dosen wie einige Milligramm pro Kilogramm Gewicht. Daher, und weil es einen nicht zu missenden intravitalen Zellbestandteil bildet, muß das Cholin als Hormon der Darmbewegungen anerkannt werden. Es ist jedoch nachweisbar, daß schon ganz geringe, noch nicht einmal merklich motilitätsbeschleunigende Gaben desselben auch andere Funktionen des Organismus, insbesondere die Tätigkeit aller Verdauungsdrüsen, beeinflussen. Aus diesem Grunde ist das Cholin, vielleicht noch mit größerem Recht als ein Sekretionshormon der Verdauungsdrüsen anzusehen. Obwohl seine erregende Wirkung auf die Darm- und Magensekretion stark hinter der einiger anderer Hormone, z. B. Methylguanidin und Carnosin, zurückbleibt, unterliegt es doch keinem Zweifel, daß auch das Cholin beim physiologischen Erregungsprozeß der Verdauungsdrüsen — und zwar möglicherweise als Ladungshormon des Parasympathicus — teilnimmt.

Hier wäre noch hervorzuheben, daß der Mechanismus sowohl der durch Cholin zu erzeugenden als auch der spontanen „periodischen" Darmsekretion einige ähnliche Züge aufweist. Auffallend ist vor allem, daß beide durch den Eintritt des sauren Mageninhalts ins Duodenum bzw. in den Dünndarm stillgelegt werden. Zieht man zudem noch in Erwägung, daß der Cholingehalt des Blutes innerhalb weiter Grenzen im Verhältnis 1 : 10 schwankt, wobei, wie schon angegeben, die höheren physiologischen Werte sich den bereits die Darmsekretion fördernden Cholingaben stark nähern, so taucht unwillkürlich die Frage auf, ob nicht irgend ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Erscheinungen — Blutcholinschwankungen und „periodische" Sekretion — besteht. Wir neigen zur Annahme, daß gerade im Erregungsprozeß der „periodischen Drüsentätigkeit" die Konzentrationsschwankungen des Blutcholins als eine der Ursachen derselben beteiligt seien.

Über die Einwirkung des Carnitins auf die Darmsekretion.

Die chemischen Eigenschaften des Carnitins legen dem Studium seiner physiologischen Wirksamkeit gewisse Schwierigkeiten in den Weg, da bis jetzt noch keine zur Einverleibung in den tierischen Organismus geeigneten und gleichzeitig gut kristallisierenden, somit leicht zu reinigenden Verbindungen desselben bekannt sind. Die Isolierung und Reinigung des Carnitins ist bekanntlich nur in Form seiner Verbindungen mit den Salzen einiger Schwermetalle möglich.

Die von uns in dieser Untersuchung verwandten Präparate des Carnitinquecksilberchlorids von der Zusammensetzung $C_7H_{15}NO_3 . 2 HgCl_2$, welche Verbindung für das Carnitin als meist charakteristisch erscheint, wurden genau nach der Methode von *Gulewitsch* und *Krimberg* (26) aus 1 bis 2 Stunden nach der Schlachtung in Verarbeitung genommenen acht Portionen Rindfleisch von insgesamt 35 kg Gewicht isoliert. Diejenigen Kristallfraktionen dieser Verbindung, welche einen Schmelzpunkt von 195 bis 205° C aufwiesen, wurden mehreremal umkristallisiert. Bei den weiter unten zu beschreibenden Versuchen verwandten wir zwei auf diese Weise dargestellte Präparate.

Präparat 1 — etwa 12 g. Zur Identifizierung wurde nur der Schmelzpunkt bestimmt. Bei schnellerem Erhitzen schmolz die Substanz bei 204 bis 205° C unter Zersetzung.

Präparat 2 — etwa 38 g. Schmelzpunkt unter gleichen Bedingungen, 204 bis 205° C. Für die Analyse wurde im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht getrocknete Substanz verwandt.

0,3789 g Substanz geben 0,2526 g HgS und 0,3111 AgCl.

$C_7H_{15}NO_3 . 2 HgCl_2$.	Ber. Hg = 56,92 Proz.;	Cl = 20,14 Proz.
(704,165)	Gef. Hg = 57,47 „	Cl = 20,27 „

Bekanntlich ist das Carnitin eine verhältnismäßig unbeständige Substanz; nicht nur alkalisch, sondern auch neutral reagierende Lösungen desselben weisen bereits bei gelindem Erwärmen einen deutlichen Trimethylamingeruch als Zeichen vor sich gehender Zersetzung auf. Es ist gerade aus diesem Grunde ziemlich schwierig, eine einwandfreie Methode ausfindig zu machen, um, von dem Carnitinquecksilberchlorid ausgehend, eine für physiologische Experimente geeignete Lösung herzustellen. In dieser Arbeit prüften wir drei dazu führende Verfahren.

Verfahren 1. Eine abgewogene Menge eines der soeben beschriebenen Präparate des Carnitinquecksilberchlorids wurde am Vortage des Versuchs in einem möglichst geringen Volumen warmen, frisch umdestillierten Wassers, wie solches auch stets in allen weiteren Prozeduren verwandt wurde, gelöst, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, filtriert, mittels Luftdurchleitung vom Schwefelwasserstoff befreit, und das mit Natriumcarbonat auf schwach positive Reaktion auf Kongo gebrachte Filtrat auf dem Wasserbade bis zu etwa 5 bis 10 Proz. Carnitingehalt eingeengt. Beim Erwärmen von Carnitinlösungen, welche so einen kleinen Überschuß an Salzsäure enthielten, waren wir niemals imstande, auch nur den geringsten Trimethylamingeruch wahrzunehmen. Am anderen Tage, unmittelbar vor der Injektion wurde dieser Lösung wieder etwas Natriumcarbonat bis zu amphoterer Reaktion hinzugefügt, dieselbe nochmals filtriert und mit Waschwasser auf einen bestimmten Carnitingehalt gebracht.

Wie aus dem Vorhergehenden folgt, enthält eine so zubereitete Lösung neben Carnitin auch etwa die gleiche Menge Natriumchlorid. Dessenungeachtet wurden von uns in einigen Versuchen derartige Lösungen angewandt. Es schien uns durchaus zweckmäßig zu sein, auf irgendwelche weitere Maßnahmen zur Befreiung vom Natriumchlorid, welche jedenfalls die Reinheit des Carnitins in Frage stellen würden, zu verzichten und in einem Teile unserer Versuche obwohl mit dem Natriumchlorid vermengtes, so doch sicherlich unzersetztes Carnitin ins Blut einzuführen. In anderen Versuchen trachteten wir danach, von Natriumchloridbeimengung freie Carnitinlösungen herzustellen, wozu uns folgende zwei Verfahren dienten.

Verfahren 2. Die im Ergebnis des Verfahrens 1 erhaltene Lösung wurde mittels Phosphorwolframsäure ausgefällt; der entstandene Niederschlag in der Kälte mit Bariumhydroxyd zersetzt; die abfiltrierte Basenlösung vom Barytüberschuß quantitativ befreit, mittels Salzsäure bis zu schwach saurer Reaktion versetzt und bei 60° C auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen eingeengt. Unmittelbar vor der Injektion wurde Natriumcarbonat bis zur amphoteren Reaktion zugefügt, filtriert und mit Waschwasser bis zu bestimmter (5 bis 10proz.) Konzentration aufgefüllt.

Als zur Herstellung einer für unsere Zwecke genügend zuverlässige. von Natriumchlorid praktisch freien Carnitinlösung geeignetste Methode betrachten wir die folgende, in einem weiteren Teile unserer Versuche benutzte.

Verfahren 3. Das Carnitinquecksilberchlorid wird mit Hilfe von Schwefelwasserstoff zerlegt, filtriert und das Filtrat vom letzteren mittels Luftdurchleitung befreit; die so erhaltene, stark saure Flüssigkeit mit frisch gefälltem Bleioxyd[1]) bis zu neutraler oder schwach alkalischer Reaktion versetzt; das neue Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert und die so gewonnene Carnitinchloridlösung, welche nunmehr eine schwach saure Reaktion auf Lackmus, aber eine negative bzw. nur kaum angedeutete positive auf Kongo zeigt, auf dem Wasserbad bis zu einem Volumen von etwa 15 bis 20 ccm eingedampft. Alle diese Operationen wurden am Tage vor dem eigentlichen Versuch ausgeführt. Bei derartiger Verarbeitung konnten wir trotz aller Achtsamkeit niemals einen Trimethylamingeruch feststellen. Unmittelbar vor der Injektion fügt man zu der Carnitinlösung noch ein paar Tropfen einer 10proz. Natriumcarbonatlösung bis zum Auftreten amphoterer Reaktion hinzu. Dann filtriert man die Flüssigkeit nochmals, wobei man mit Waschwasser die Lösung auf den benötigten Carnitingehalt bringt. Es ist zu betonen, daß in allen drei Verfahren jegliches Erwärmen außer bei saurer und vorwiegend ganz schwach positiver Reaktion auf Kongo sorgfältigst vermieden wurde und daher alle Operationen notwendigerweise steril durchgeführt werden mußten.

Die Carnitinwirkung auf die Darmsekretion wurde an denselben drei Tieren geprüft, welche bereits aus den oben beschriebenen, dem Studium des Cholins gewidmeten Versuchen bekannt sind.

Das Carnitin zeitigte in allen Fällen ein qualitativ stets gleiches Wirkungsbild, unabhängig davon, auf welche Weise die injizierte Carnitinlösung zubereitet worden war. Aufs deutlichste prägt sich dasselbe im Versuch 23 aus, in welchem dem Hunde 4 (*Thiry-Vella*sche Darmfistel und einfache Magenfistel) 2,3 g Carnitin (auf freie Base umgerechnet) in nach dem Verfahren 3 zubereiteter Lösung in die V. jugularis ext. im Laufe einer Minute eingeführt wurden. Schon während der Injektion traten kurz andauernde Beschleunigung und Vertiefung der Atmung sowie merkliche Beschleunigung des Pulses unter Verminderung seiner Spannung und deutliche Salivationssteigerung auf, zu welchen ferner nach etwa 3 Minuten Knurren in der Bauchtiefe und Erbrechensbewegungen kamen. Nach einer latenten Periode von

[1]) Noch besser erschiene hier natürlich die Verwendung von Silberoxyd.

5 Minuten flossen aus der Magenfistel etwa 2 ccm Galle, und nach noch einigen Sekunden zeigte sich der erste Tropfen sauren Magensaftes. Gleichzeitig begann auch die Absonderung von Darmsaft aus dem unter Schonung der mesenterialen Nerven isolierten Darmabschnitte. Die erregende Wirkung des Carnitins auf die Darmsekretion trat in diesem Versuch sehr klar zum Vorschein. Erstens betrug der Zeitraum zwischen dem Beginn der nach Carnitineinverleibung erfolgten Darmsekretion und der ihr vorhergegangenen normalen Periode der spontanen Darmdrüsentätigkeit nur 40 Minuten, während die gewöhnliche Ruhepause zwischen den einzelnen Tätigkeitsperioden für den gegebenen Tag annähernd 120 Minuten währte. Zweitens dauerte die durch Carnitin ausgelöste Darmsekretion nicht 5 bis 10 Minuten, wie die spontane „periodische", sondern, sehr gleichmäßig in ihrer Intensität abnehmend, beinahe 90 Minuten, wonach die nächste fällige Welle der spontanen Darmdrüsentätigkeit einsetzte, welche auf diese Weise von der vorhergehenden ebenfalls durch den gewöhnlichen Zeitraum von etwa 2 Stunden getrennt war. Ihrem Ausmaß nach erwies sich die durch Carnitin hervorgerufene Leistung der Darmdrüsen als eine sehr beträchtliche; es wurden 4,7 ccm Darmsaft gegen 2,0 bis 2,6 ccm bei

Versuch 23.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Carnitins etwa 164 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
12h30′	—	—	95	Beginn der Beobachtung
12 45	2,6	Schleim alkal.	95	
2 30	0	—	100	
2 45	2,0	—	95	
8 25	0	Schleim alkalisch	90	*Injektion: 2,3 g Carnitin* in 25 ccm Aq. gelöst (Präparat 2, Verfahren 3) im Laufe von etwa 60 Sek. intraven.
3 26	0		120	Dyspnoe, Speichelfluß
3 27	0		115	Erbrechensbewegungen, Knurren in den Gedärmen
3 30	↗	HCl +, 2.0 Galle	110	
3 45	3,0	34,0 Magensaft	105	Speichelfluß
4 00	1,0	3,0 „ Gesamtacidität = 41, HCl = 24	100	Beleckt sich zeitweise
4 15	0,3	1,0 Magensaft Gesamtacidität = 41. HCl = 24	100	
4 30	0,2	Schleim alkalisch	100	
4 45	0,2		100	Beleckt sich nicht mehr
5 00	0,9		100	

Versuch 24.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Carnitins etwa 97 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
3h15'	—	Schleim alkalisch	80	Beginn der Beobachtung
3 30	0,9		85	
3 35	0,2		85	
4 00	0		85	
4h00–01'	0		85—120	*Injektion: 1,34 g Carnitin* in 25 ccm Aq gelöst (Präparat 2, Verfahren 1) in die V. jugul. ext. im Laufe von etwa 60 Sek.
4h02'	0		125	Stuhldrang, häufiges Knurren in den Gedärmen
4 06	↗	↗	80	Knurren in den Gedärmen
4 10	0,3	—	80	
4 20	0	6,0 Gesamtacidität=1,8 HCl = 0	80	
4 35	0	1,5	85	
4 50	0,3	0,5	85	Knurren in den Gedärmen
5 05	1,0	0,5	80	
5 20	0	Schleim alkalisch	85	
6 00	0		85	

Versuch 25.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Carnitins etwa 90 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
3h00'	0	Schleim alkalisch	95	Beginn der Beobachtung
4 30	0		90	
4 45	2,5		95	
5 10	0		95	
5h10–12'	0		95—130	*Injektion: 1,2 g Carnitin*, intravenös, im Laufe von etwa 2 Min. (10proz. Lösung, Präparat 2, Verfahren 1)
5h20'	0	Schleimh. sauer	100	
5 30	0	2,0 Ges.-Acid.=12 HCl = 0	95	
5 45	0	0,5	95	
6 30	0	Schleim alkal.	95	
6 45	0,8	Schleim alkal.	95	
8 00	0		95	

Versuch 26.

Hund 2 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 10 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosen des Carnitins 70 und 80 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel: Menge ccm	Gesamtacidität	HCl	Puls	Atmung	Bemerkungen
12h20'	—	—	—		100	11	Beginn der Beobachtung
12 30	0	1,0			95	11	
12 40	0	1,0			95	11	
12 50	0,3	5,0 Schleim			95	11	
1 00	0,1	0,5			95	11	
1 10	0	0		0	95	11	
1 40	0	0			95	11	
1 50	0	0,3	alkalisch		100	9—11	Knurren in den Gedärmen
2 00	0,3	0			95	9—11	
2 10	0	0,2			85	9	
2 20	0	0,2			85	9	
2 30	0	0,2			85	9	
2 44	0	0,5			90—120	9	*Injektion: 0,7 g Carnitin,* intravenös (10 proz. Lösung, Präparat 1, Verfahren 2)
2 50	↗	↗	sauer	+	140	19	Knurren in den Gedärmen
3 00	0,8	4,0	50	35	140	18	
3 10	0	1,0	48	30	105	18	
3 20	0	1,0	48	30	90	18	
3 30	0	1,0	48	30	100	12	Knurren in den Gedärmen
3 40	0	1,0	24	4	95	12	
3 50	0	1,0		0	95	12	
4 00	0	1,0	alkalisch	0	95	12	
4 09	0	0,5		0	95—100	12	*Injektion: 0,8 g Carnitin,* intravenös (dieselbe Lösung)
4 14	↗	↗	sauer	+	150	20	Knurren in den Gedärmen
4 25	1,6	8,5	92	75	130	18	
4 35	0	4,0	92	75	120	16	
4 45	0	2,5	93	73	100	14	
4 55	0	1,0	93	73	95	14	
5 05	0	2,7	93	73	100	14	
5 15	0	1,0	72	52	105	14	
5 25	0	0,5	72	52	105	14	Häufiges Knurren in den Gedärmen
5 35	0	0,5	72	52	95	14	

um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Carnitins 60 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel: Menge ccm	Gesamtacidität	HCl	Pepsin nach *Fuld*	Puls	Atmung	Bemerkungen
1h05'	—	—	—	—		90	10	Beginn der Beobachtung
1 15	0,4	0,2	sauer	0		90	10	
1 25	0	0,2				80	10	
1 35	0	0,6	neutral	0		80	10	
1 45	0	0,3				90	10	
1 55	0,1	5,7				85	10	
2 05	0,3	5,0				90	10	
2 15	0,3	1,0				85	10	
2 25	1,0 } Erepsin = 3,0	2,0	sauer	0		85	10	
2 35	0,8	2,0				85	10	
2 45	0,1	2,0				85	10	
2 55	0,1	1,0				85	10	
3 05	0	1,0	alkalisch			85	10	
3h15'	0	1,0	"			?	?	*Injektion: 0,6 g Carnitin,* intravenös (10 proz. Lösung, Präparat 1, Verfahren 2)
3 23	0	↗	sauer	+		110	10	
3 25	↗	1,0				110	10	
3 35	1,7	1,8				110	10	
3 45	0,1 } Erepsin = 2,8	1,2				110	10	
3 55	0	0,2				90	10	
4 05	0	4,8	58	33	125	90	10	
4 15	0	3,0				90	10	
4 25	0	2,0				90	10	
4 35	0,1	0,2				85	10	
4 45	0	0,2				85	10	
4 55	0	1,0 Galle				85	10	
5 05	0,1	1,0				85	10	
5 15	0,1	1,0				85	10	
5 25	0	1,0 } Schleim	28	0	65	90	10	Knurren in den Gedärmen
5 35	0,4	1,9				90	10	
5 45	0	0,5				90	10	
5 55	0	0				90	10	
6 05	0	0				90	10	
6 15	0	0				90	10	

spontaner „periodischer“ Sekretion ausgeschieden. Auch die nach Carnitineinverleibung erfolgte Magensekretion war nicht unbedeutend; während 30 Minuten sezernierten 37 ccm reinen Magensaftes von einer Gesamtacidität = 41. Ebensolange konnte gesteigerte Speichelabsonderung beobachtet werden. Im ganzen waren die Folgeerscheinungen der Carnitininjektion beinahe 90 Minuten lang wahrzunehmen; nur der Puls kehrte schon nach 15 Minuten zur Norm zurück. Eine Dosis von 0,164 g pro Kilogramm Gewicht erwies sich somit nicht nur als in vielen Beziehungen wirksam, sondern bereits, wenn auch nur schwach toxisch. Weitere unter Anwendung kleinerer Gaben von 90 bis 60 mg pro Kilogramm Gewicht an zwei mit *Thiry-Vella*scher Darmfistel und einfacher Magenfistel versehenen Hunden angestellte Versuche zeigten, daß das soeben geschilderte Wirkungsbild als für Carnitin typisch anzusehen ist; es wurden auch hier Steigerung der Drüsentätigkeit im unter Schonung der mesenterialen Nerven losgetrennten Darmteile, deutliche Magensekretion, gesteigerte Darmmotilität, sowie Atem- und Pulsbeschleunigung beobachtet, während die Erbrechensbewegungen in diesen Fällen ausblieben (vgl. Versuche 24 bis 27). Beim Betrachten dieser Versuchsreihe fällt es jedoch auf, daß die Carnitinwirkung quantitativ nicht immer die gleiche war. So scheint bei Hund 4 z. B. bereits eine Carnitingabe von 85 mg pro Kilogramm Gewicht im allgemeinen kaum, auf die Darmsekretion überhaupt nicht wirksam zu sein; während am Hund 2 sogar kleinere Dosen, wie 80, 70, bis 60 mg pro Kilogramm Gewicht noch ganz deutliche Darm- und Magensekretion sowie auch alle anderen oben als typisch angeführten Wirkungserscheinungen hervorriefen. Ähnliches wurde von uns früher auch hinsichtlich der Wirkungsweise einiger anderer Substanzen — insbesondere Cholin und Carnosin — beobachtet In dieser Beziehung dürfte wohl vieles von der individuellen Konstitution des Tieres abhängig sein. Die ausschlaggebende Rolle muß hier, unseres Erachtens, der augenblicklichen Höhe des Bluthormonspiegels zugeschrieben werden. Nur von diesem Gesichtspunkt aus ist es verständlich, daß bei gleichen Bedingungen in den einzelnen Versuchen, z. B. die Schwellengaben des Cholins bei intravenöser Applikation zwischen 2 und 9 mg pro Kilogramm Gewicht schwanken. Auf ähnliche Weise schwanken auch die minimalen noch wirksamen Carnitingaben. Unseren Beobachtungen zufolge liegen dieselben in bezug auf die Darmsekretion bei intravenöser Applikation zwischen 90 und 50 mg pro Kilogramm Gewicht.

Zuletzt möchten wir auch noch die Resultate einiger Versuche, welche zur Ermittlung des Mechanismus der Carnitineinwirkung auf die Darmsekretion beitragen könnten, mitteilen. Die Ausschaltung des extraintestinalen Nervensystems zieht, wie aus Versuch 28 ersichtlich,

das Ausbleiben der erregenden Wirkung des Carnitins auf die Darmsekretion nach sich. In diesem Falle vermochte selbst eine sehr große, beinahe toxische Carnitingabe von 0,14 g pro Kilogramm Gewicht beim Hunde 5 keine Sekretion aus dem „nervenlosen" Darmteile hervorzurufen, während alle anderen Wirkungserscheinungen in ganz typischer Weise auftraten.

Versuch 28.

Hund 5 („Nervenlose" Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 10 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags. Angewandte Dosis des Carnitins etwa 140 mg freier Base pro Kilogramm.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausschdidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
3h00'	—		70	Beginn der Beobachtung
3 15	0,5		65	
3 45	0	Schleim alkalisch	70	
4 00	0,2		65	
4 15	0		70	
4h18'	0		70—120	*Injektion: 1,4 g Carnitin,* intravenös, im Laufe von 30 Sek (10 proz. Lösung, Präparat 2, Verfahren 1)
4 20	0	4,0 Galle	120	Knurren in den Gedärmen
4 24	0	↗	95	
4 30	0	12,0 } Gesamtacidität = 58, HCl = 36	70	Knurren in den Gedärmen
4 45	0	3,0	70	
5 00	0	2,0	65	
5 15	0	1,0	65	
5 30	0,6	0,5	70	
5 45	0	} Schleim alkalisch	65	
6 15	0		65	
6h18'	0		65	*Injektion: 10,0 ccm 10 proz. NaCl-Lösung*
7 30	0		70	

Sehr interessante Ergebnisse lieferten die Versuche, in welchen die Carnitinwirkung an vorher atropinisierten Tieren verfolgt wurde (Versuche 29 und 30). Es stellte sich heraus, daß das Atropin, sogar in sehr großen Dosen von mehr als 7 mg pro Kilogramm Gewicht subkutan eingeführt, nicht imstande war, die erregende Wirkung des Carnitins sowohl auf die Darm- als auch auf die Magensekretion vollständig zu hemmen; dieselbe schien nur geringer auszufallen als nach einer solchen Carnitindosis zu erwarten war. Ebenfalls war auch hier die die Darmmotilität beschleunigende Wirkung des Carnitins feststellbar. Die vorhergehende Atropinisierung verursachte ferner eine Umkehrung der gewöhnlichen Carnitinwirkung auf den Blutkreislauf; der Puls

wurde nicht wie sonst beschleunigt, sondern verlangsamt; ebenso wurd die Pulsfüllung nicht herabgesetzt, sondern merklich erhöht. Di gewöhnliche Carnitinwirkung auf die Atmung (Dyspnoe währen ½ bis 2 Minuten nach Injektion) wurde durch Atropin sichtbarlid nicht verändert. Es erweist sich also, daß das Carnitin hinsichtlid des feineren Mechanismus seiner Wirkung auf den Organismus voi den Hormonen des Cholintypus in vielem merklich abweicht.

Versuch 29.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel). Gewicht 14 kg

Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 2 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
8h30′	—	—	—	
9 30	0	Schleim alkalisch	95	
9 45	1,7			
10 00	0,6			
10 15	0			
10 30	0			*Injektion: 0,007 g Atrop. sulf.*, subk
10 35	0	0	210 mollis	
10 50	0	0	240	*Injektion: 0,003 g Atrop. sulf.*, subk
11 00	0	0	240	Mydriasis completa, Pupillenreaktion auf Licht fehlt, Schleimhäute trocken, halluziniert
11h 03-05′	0	0	240	*Injektion: 2,2 g Carnitin*, intravenös im Laufe von etwa 2 Min. (10 proz Lösung, Präparat 2, Verfahren 3)
11h04′	0	0	180 durus	Dyspnoe
11 05	0	0	190	Mydriasis completa, Pupillenreflex auf Licht fehlt, Mundschleimhaut trocken, halluziniert
11 07	0	0	210	Knurren in den Gedärmen, Darmbewegungen in den Fistelöffnungen
11 08	↗	↗	230 mollis	*Injektion: 0,002 g Atrop. sulfur.*, subkutan
11 25	1,8	0,5 sauer, HCl +	240 Stark verminderte Spannung	
11 40	0,1	0,3	240	
11 55	0	0 Schleimhaut alkalisch	240	
12 10	0	0	210	
12 25	0	0	200	*Injektion: 0,002 g Atrop. sulfur.*, subkutan
12 30	0	0	240	
12 40	0	0	240	*Injektion: 0,2 g salzsaures Cholin*, intravenös (5 proz. Lösung)
12h40-45′	0	0	> 300 Kaum wahrnehmbar	Sehr starke Dyspnoe
12h55′	0	0	> 300	
1 00	0	0		
1 05	0	Schleimhaut sauer	250	
1 10	0		210 mollis	Sehr unruhig
1 25	0	Schleimhaut alkalisch	210	
1 40	0		200	
2 00	0		190	

Versuch 30.

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Jejunumfistel, Magenfistel) Gewicht 14 kg. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 2 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge d. Darmsaftes ccm	Ausscheidung aus der Magenfistel ccm	Puls	Bemerkungen
8h00'		Schleimhaut alkalisch (8h00'–10 34)	95	Beginn der Beobachtung
10 00	0		95	
10h15'	1,3		95—105	*Injektion: 0,002 g Atrop. sulf.*, subk.
10 30	0		275 mollis	Mydriasis incompleta, Pupillenreaktion auf Licht geschwächt
10h33'	0		—	*Injektion: 1,3 g Carnitin*, intravenös, im Laufe von etwa 30 Sek. (10 proz. Lösung, Präparat 2, Verfahren 3)
10 34	0		190 } durus	Dyspnoe, Speichelfluß (10 34–12 00: Mydriasis incompleta, Pupillenreaktion auf Licht stark geschwächt)
10 35	0	Schleimhaut sauer (10 35–10 38)	210 } durus	
10 36	0		240 } mollis (10 36–12 00)	Knurren in den Gedärmen, Darmbewegungen in den Fistelöffnungen
10 37	0		270	
10 38	↗		270	
10h45'	1,0	2,0 } Gesamtacidität = 30, HCl = 12 (2,0–0,5)	240	*Injektion: 0,001 g Atrop. sulf.*, subkutan
11 00	0,2	1,5	240	
11 15	0	0,5	220	
11 30	0	0,5	220	
11 45	0	0,5	220	
12 00	0	Schleimhaut alkal.	210	

Zusammenfassend, gelangen wir aus unseren Versuchen zu dem Schlusse, daß dem Carnitin zweifellos die Fähigkeit eignet, die Tätigkeit der Darm-, Magen- und Speicheldrüsen, sowie die Darmmotilität zu erregen und ebenfalls den Blutkreislauf und die Atmung zu beeinflussen. Da ferner das Carnitin nicht nur als intravitaler Bestandteil des Muskelgewebes, sondern auch im Harn (als Novain) von *Kutscher* und seinen Mitarbeitern nachgewiesen wurde (27) und somit sicherlich auch im Blute vorkommt, besitzt es unzweifelhaft die Eigenschaften eines Hormons, in dessen Wirkungsbereich auch die Darmsekretion liegt. Vergleichen wir jedoch die Größe der wirksamen Dosen mit dem Eigengehalt des Organismus an Carnitin, so können wir demselben in den im Blute möglicherweise anzutreffenden Konzentrationen in bezug auf die Darmsekretion nur eine mitwirkende Rolle zuerkennen.

Im Muskelgewebe des Hundes sind nämlich nach unseren noch nicht veröffentlichten Untersuchungen ungefähr 0,3 Prom. Carnitin enthalten. In der ganzen Muskulatur eines mittelgroßen Hundes von 10 kg Gewicht dürfte also etwa $\frac{0,3 \cdot 10}{3} = 1,0$ g dieser Base vorhanden sein. Die minimale, noch exzitosekretorisch auf Darm- und Magendrüsen wirkende Dosis von 0,05 g pro Kilogramm Gewicht bzw. = 0,5 g für einen Hund von 10 kg, macht auf diese Weise etwa die Hälfte des gesamten Carnitingehaltes im Organismus aus. In dieser Beziehung

steht also das Carnitin als Funktionerreger der Darmdrüsen allerding weit hinter einigen anderen von uns untersuchten Muskelhormonen – dem Methylguanidin, Carnosin und Cholin — zurück.

Literatur.

1) *W. Gulewitsch* und *R. Krimberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45** 326, 1905. — 2) *R. Krimberg*, ebendaselbst **48**, 412, 1906. — 3) *Derselbe* ebendaselbst **53**, 514, 1907. — 4) *W. Skworzow*, ebendaselbst **68**, 36, 1910. – 5) *I. Smorodinzew*, Ber. d. Akad. d. Wiss., St. Petersburg 1916, S. 1535. – 6) *Derselbe*, Journ. d. russ. physik.-chem. Ges. (chem. Teil) **49**, 266, 1917. – 7) *R. Krimberg*, diese Zeitschr. **157**, 187, 1925; Die Hormone usw. Charkow 1918. — 8) *Kutscher*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **11**, 582, 1906. (vgl. auch *E. Geiger* und *O. Loewi*, diese Zeitschr. **127**, 174, 1922). – 9) *Lohmann*, Zeitschr. f. Biol. **56**, 1, 1911; *A. Desgrez*, Soc. Biol. **54**, 839, 1902; *O. v. Fürth* und *C. Schwarz*, Pflügers Arch. **124**, 427, 1908. – 10) *Kutscher*, Zeitschr. f. Unters. f. Nahr.- u. Genußm. **10**, 528, 1905; **11**, 582, 1905. — 11) *R. Krimberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**, 466, 1908. — 12) *Derselbe*, ebendaselbst **56**, 417, 1908. — 13) *Kutscher*, ebendaselbst **49**, 49, 1906. — 14) *Ackermann*, Zeitschr. f. Biol. **59**, 433, 1913; **61**, 373, 1913; Ber. d. deutsch. chem. Ges. **54**, 2, 2208, 1921. – 15) *S. Komarow*, diese Zeitschr. **146**, 122, 1924; **147**, 221, 1924; **151**, 467, 1924. — 16) *Guggenheim* und *Löffler*, ebendaselbst **74**, 208, 1916. — 17) *Golowinski*, Pflügers Arch. **159**, 93. — 18) *Sawitsch*, Setschenoffs russ. physiol. Journ. **2**, H. 1/3, S. 91, 1919; *Sawitsch* und *Soschestwenskij*, ebendaselbst **3**, H. 1/3, S. 43, 1921. — 19) *Brinkman* und *Ruiter*, Pflügers Arch. **204**, 766, 1924. — 20) *Mitsuda*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **39**, 330, 1924 (zitiert nach Ber. d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **27**, 122). — 21) *C. Schwarz*, Zentralbl. f. Physiol. **23**, 337, 1909. — 22) *Weiland*, Pflügers Arch. **147**, 171, 1912. — 23) *Le Heux*, ebendaselbst **173**, 8, 1918; **179**, 177, 1920; **190**, 280, 301, 1921. — 24) *Spatz* und *Wiechmann*, Münch. med. Wochenschr. **71**, 1425, 1924. — 25) *Le Heux*, Arch. neerland. de physiol. de l'homme et des anim. **9**, 277, 1924 (zitiert nach Ber. d. ges. Physiol. u. Pharm. **28**, 250). — 26) *R. Krimberg*, Hoppe-Seyler-Tierfelders Handb. d. physiol.-chem. Analyse 1909, S. 758—761. — 27) *Kutscher* und *Lohmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**, 1, 1906; *Kutscher*, ebendaselbst **51**, 457, 1907.

Zur Nephelometrie der Blutlipoide.

Von

Gunnar Blix.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 1. November 1925.)

Besonders durch *Kleinmann*[1]) ist die Nephelometrie während der letzten Jahre zu einer Methode entwickelt worden, welche für die quantitative Bestimmung einer ganzen Serie von Substanzen sich sehr gut bewährt hat.

Bei den Versuchen, ein nephelometrisches Verfahren zur Bestimmung von Blutlipoiden anzuwenden, ist man indessen auf ganz bestimmte Schwierigkeiten gestoßen. Diese beruhen vor allem darauf, daß man es hier nicht mit einer einheitlichen Substanz zu tun hat, sondern mit einer Mischung von Substanzen, deren für die Nephelometrie hergestellte Suspensionen sehr verschiedene Eigenschaften aufweisen können. Die erste Bedingung für eine gemeinsame nephelometrische Bestimmung mehrerer Substanzen (die in wechselnden Mischungsverhältnissen vorkommen) ist die, daß die Substanzen einen identischen nephelometrischen Wert[2]) (= n. W.) besitzen. Namentlich diese Bedingung hat sich in bezug auf die Blutlipoide als schwer erfüllbar gezeigt.

Vor einiger Zeit habe ich[3]) im Zusammenhang mit einer kritischen Untersuchung der *Bloor*schen Methode für die Bestimmung der totalen Fettsäuremenge des Blutes auch die von *Bing* und *Heckscher*[4]) in dieser Zeitschrift publizierte nephelometrische Methode zur Bestimmung des „primären Ätherextraktes“ des Blutes kürzlich einer Prüfung unterworfen. Dabei habe ich unter anderem gefunden, daß die Forderung

---

[1]) Literatur s. *H. Kleinmann*, Kolloidzeitschr. **36**, 168, 1925.

[2]) Mit „nephelometrischer Wert“ wird in dieser Arbeit der Trübungsgrad bezeichnet, der von einer gegebenen Menge einer nach bestimmten Vorschriften suspendierten Substanz produziert wird.

[3]) *G. Blix*, Skand. Arch. f. Physiol. **46**, 121, 1924.

[4]) *H. I. Bing* und *H. Heckscher*, diese Zeitschr. **149**, 79, 1924.

nach identischen n. W. von den zu bestimmenden Substanzen, das sind Neutralfette und Cholesterin, nicht erfüllt war. Die Methode schien auch in vielen anderen Hinsichten unzulänglich durchgearbeitet zu sein. Ich habe sie daher als unzuverlässig bezeichnet.

Neuerdings haben *Bing* und *Heckscher* einige „erläuternde und korrigierende Bemerkungen"[1]) über ihre Methode veröffentlicht. In dieser Publikation haben sie mir darin recht gegeben, daß der „primäre Ätherextrakt" des Blutes nicht, wie sie gemeint haben, hauptsächlich aus Neutralfett besteht, sondern außer Neutralfett das freie Cholesterin des Blutes quantitativ enthält. Daneben teilen sie aber Versuche mit, die im Gegensatz zu meinen zu zeigen scheinen, daß 1. der n. W. von Neutralfetten und Cholesterin identisch ist und daß 2. eine Veränderung des Trübungsgrades der mit den extrahierten Blutlipoiden hergestellten Suspensionen innerhalb der für die nephelometrische Bestimmung angegebenen Zeit nicht zu befürchten ist. Damit glauben sie meine Kritik erledigt und ihre Methode gerechtfertigt zu haben. Auf eine Erklärung der Diskrepanz unserer Befunde wird nicht eingegangen.

Im folgenden soll gezeigt werden, daß die von *Bing* und *Heckscher* mitgeteilten Versuche keineswegs hinreichend sind, um ihre Methode zu rechtfertigen, und gleichzeitig soll die Tatsache illustriert werden, daß man bei der Ausarbeitung einer nephelometrischen Methode ohne sorgfältige Durchprüfung aller Faktoren, welche auf die Entwicklung und Stärke der Trübungen einwirken können, *nicht* auskommen kann.

Die Methode von *Bing* und *Heckscher* gründet sich auf Ätherextraktion des luftgetrockneten Blutes, Abkochung des Äthers, Auflösung des Rückstandes in 99,5proz., warmem Alkohol, Abkühlung in kaltem Wasser, Fällung der Lipoide mittels gleichfalls abgekühlter 1proz. $BaCl_2$-Lösung, Umschütteln und Vergleichung der Trübung mit einem Standard in einem von *Heckscher* konstruierten Nephelometer. Die Vergleichung kann nach den Autoren *zwischen 15 und 120 Minuten nach der Präzipitation* vorgenommen werden. Als Standard wird eine Serie Kaolin-Gelatinesuspensionen bekannten Trübungsgrades angewandt.

In den folgenden Versuchen habe ich dasselbe Vorgehen wie in meiner früheren Kritik benutzt. Die Lipoide wurden in 99,5proz. Alkohol gelöst, und genau abgemessene Mengen der Lösungen mit der fünffachen Menge der 1proz. $BaCl_2$-Lösung nach den Vorschriften von *Bing* und *Heckscher* gefällt. Die Suspensionen wurden mit einem konstanten Standard in einem Kobernephelometer verglichen.

Bei meiner früheren Prüfung fand ich, daß die Trübungsstärke reiner Trioleinsuspensionen während der ersten Stunde nach der Fällung kontinuierlich abnahm, und daß eine, obgleich etwas weniger ausgesprochene Abnahme der Trübungsstärke auch in einer Suspension

---

[1]) *H. I. Bing* und *H. Heckscher*, diese Zeitschr. 158, 395, 1925.

gleicher Mengen Triolein und Cholesterin auftrat. In Tabelle I sind einige weitere Versuche dieser Art dargestellt.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Suspensionen		Zeit nach der Fällung Min.	Nephelometrische Ablesung	Steigerung Proz.
	Triolein mg	Cholesterin mg			
			15	20,4	
1	1	0	30	22,6	24
			60	25,2	
			15	20,1	
2	1	0	30	22,1	24
			60	25,0	
			15	27,5	
3	0	1	30	27,7	—
			60	27,8	
			15	27,3	
4	0	1	30	27,6	—
			60	27,5	
			15	20,9	
5	0,25	0,75	30	21,1	—
			60	21,5	
			15	31,8	
6	0,75	0,25	30	34,8	22
			60	38,8	
			15	24,8	
7	0,50	0,50	30	26,9	19
			60	29,5	

Die in den Tabellen I und II unter „Nephelometrische Ablesung" angegebenen Zahlen sind überall als Mittelzahl von fünf unmittelbar nacheinander vorgenommenen Ablesungen erhalten. Der Standard wurde innerhalb der einzelnen Versuche natürlich konstant gehalten. Von Versuch zu Versuch ist er indessen gelegentlich verändert worden.

Wie ersichtlich, bestätigen diese Versuche meine frühere Beobachtung über die Instabilität der Trioleinsuspensionen. Zudem sieht man, daß die reinen Cholesterinsuspensionen eine gute Stabilität aufweisen. Von den gemischten Suspensionen zeigen diejenigen mit 75 bzw. 50 Proz. Triolein eine nicht unbeträchtliche Instabilität, während die Suspension mit nur 25 Proz. Triolein nur eine unbedeutende Abnahme der Trübungsstärke aufweist.

Diese Versuche lehren daher, daß in den nicht allzu seltenen Fällen, wo der Ätherextrakt des Blutes relativ große Neutralfettmengen im Verhältnis zum Cholesterin enthält, auf eine Konstanz der Trübung innerhalb der für den nephelometrischen Vergleich angegebenen Zeit *nicht* gerechnet werden kann.

Bing und *Heckscher* haben nun bei der Ausarbeitung der Methode die zeitliche Entwicklung der Trübungen reiner Neutralfett- und Cholesterin-

suspensionen anscheinend nicht studiert. Dafür teilen sie aber eine Serie von 30 Blutanalysen mit, bei denen die Trübung sowohl 15 als 120 Minuten nach der Fällung bestimmt wurde. Hier wurde kein größerer Unterschied der Trübungsgrade in den einzelnen Proben bei den genannten Zeitpunkten gefunden. Hierzu ist folgendes zu bemerken. In 17 von den 30 Analysen wurden normale Werte für die Fett-Cholesterinmenge gefunden. Wie *Bang*[1]) gezeigt hat und ich[2]) später habe bestätigen können, besteht der primäre Äther- (Petroläther-) Extrakt des Blutes normalerweise in den meisten Fällen nur zu 0 bis 30 Proz. aus Neutralfett, zum größten Teil also aus Cholesterin. Daß in jenen 17 Analysen keine Veränderung der Trübung gefunden wurde, erscheint daher an der Hand meiner oben mitgeteilten Versuche völlig erklärlich. Die 13 übrigen Analysen der Serie weisen nur sehr unbedeutend hypernormale Werte auf, in keinem Falle einen so hohen Wert, daß es wahrscheinlich ist, daß mehr als die halbe Menge des Extrakts aus Neutralfett bestände. (Übrigens zeigen von diesen 13 Analysen tatsächlich 10 einen geringeren Trübungsgrad in der letzteren als in der ersteren Bestimmung, davon neun 7 bis 15 Proz. geringeren, während von den 17 erstgenannten Analysen nur 6 einen verminderten Endwert aufweisen, davon nur 3 einen mehr als um 7 Proz. verminderten.)

Die in Tabelle I zusammengestellten Versuche geben uns noch einen wichtigen Aufschluß, den nämlich, daß ein identischer n. W. des Trioleins und Cholesterins nur zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt nach der Fällung existieren kann. Hierauf werde ich unten sogleich zurückkommen.

Von den Faktoren, von denen es bekannt ist, daß sie auf den Trübungsgrad einer Suspension einwirken können, sind die Temperaturen der zu vermischenden Lösungen nicht zu vernachlässigen. Auch dieser Faktor ist indessen von *Bing* und *Heckscher* offenbar nicht näher studiert worden. Nach den Vorschriften der Autoren sollen die erwärmte alkoholische Lipoidlösung nebst der $BaCl_2$-Lösung vor der Vermischung in „kaltem, fließendem Wasser“ abgekühlt werden. Da in unseren Gegenden das Leitungswasser eine Jahreszeitdifferenz von etwa 10^0 aufweisen kann, liegt offenbar die Möglichkeit vor, daß der Mangel an genaueren Vorschriften in bezug auf die Temperatur zu bedeutenden Fehlern Anlaß geben kann. Die in Tabelle II wiedergegebenen Versuche zeigen, daß dies in der Tat zutrifft.

Die alkoholischen Lösungen der Lipoide und die $BaCl_2$-Lösung wurden in den einzelnen Versuchen auf dieselbe Temperatur gebracht und die nephelometrische Bestimmung nach 15 Minuten Stehenlassen bei Zimmertemperatur wie oben ausgeführt.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß, während die Trübungsstärke der Trioleinsuspensionen bei den geprüften Temperaturen nicht sichtlich differiert, der Einfluß der Temperatur auf den Trübungs-

[1]) *J. Bang*, Über Lipämie. I. Diese Zeitschr. **90**, 383, 1918.
[2]) *G. Blix*, Studies on diabetic Lipemia. Diss. Lund, 1925.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Suspensionen Triolein mg	Suspensionen Cholesterin mg	Temperatur der Lösungen bei der Vermischung	Nephelometrische Ablesung
1	1	0	8—10° 18—20	20,3 20,8
2	1	0	8—10 18—20	20,2 20,5
3	0	1	8—10 18—20	47,0 27,5
4	0	1	8—10 18—20	29,0 19,1
5	0	1	8—10 18—20	28,4 18,9
6	0,5	0,5	8—10 18—20	22,7 22,1
7	0,1	0,9	8—10 18—20	22,6 17,0

grad der Cholesterinsuspensionen ein ganz erheblicher ist. (Bei einer noch niedrigeren Temperatur als der in der Tabelle angegebenen wurde in einem Falle eine Ausflockung des Cholesterins unmittelbar nach der Vermischung beobachtet.) Von den gemischten Suspensionen zeigt die mit gleichen Teilen Triolein und Cholesterin keine sichere Differenz des Trübungsgrades bei verschiedenen Temperaturen, während die mit Cholesterin und Triolein im Verhältnis 9 : 1 einen erheblichen Unterschied aufweist. Da im Ätherextrakt des Blutes Neutralfett bisweilen ganz vermißt wird [*Bang*[1]), *Blix*[2])] und unter normalen Verhältnissen jedenfalls den kleineren Teil des Extraktes ausmacht, so ist der Temperaturfaktoı sicher auch bei den Blutanalysen in Rechnung zu ziehen.

Bei einer Temperatur der Lösungen bei der Vermischung von 15° und Bestimmung des Trübungsgrades 30 Minuten nach der Präzipitation ist meiner Erfahrung nach der n. W. des Cholesterins mehr als doppelt so groß als der des Trioleins. Ein genauer Vergleich ist wegen des sehr bedeutenden Unterschiedes der Farbennuancen der Suspensionen unmöglich[3]).

[1]) *I. Bang,* l. c.

[2]) *G. Blix,* l. c.

[3]) Bei der erheblich wechselnden Zusammensetzung des „primären Ätherextraktes" dürfte die Anwendung eines konstanten Standards (wie der *Bing* und *Heckscher*sche) daher die Genauigkeit der Bestimmung oft nicht unwesentlich beeinträchtigen.

Da 1. der Trübungsgrad der Trioleinsuspensionen kontinuierlich mit der Zeit abnimmt, jener der Cholesterinsuspensionen mindestens 1 Stunde nach der Fällung konstant bleibt, und 2. mit fallender Temperatur der Trübungsgrad der letzteren abnimmt, jener der ersteren nicht beeinflußt wird, so nähern sich die n. W. des Cholesterins und des Trioleins offenbar mit fallender Temperatur und kürzerem Stehenlassen der Suspensionen, um bei einem bestimmten Punkt (bzw. Punkten) eventuell zusammenzufallen.

In einigen Versuchsreihen mit Triolein und Cholesterin sowie mit Mischungen dieser Substanzen fanden nun *Bing* und *Heckscher* durchweg annähernd gleichen Trübungsgrad bei gleichen Konzentrationen der Suspensionen (d. h. einen identischen n. W. der betreffenden Substanzen). Diese Tatsache macht es nun zu einem gewissen Grade wahrscheinlich, daß ein solcher Punkt, wie eben erwähnt wurde, in der Tat existiert und daß die Autoren bei ihren Versuchen mit Triolein und Cholesterin relativ konstante Ablesungszeit bzw. Mischungstemperatur angewandt haben. Allerdings wird hierüber nichts berichtet. *Für die Verwendbarkeit der Methode ist die genaue Präzisierung des genannten Punktes eine unabweisbare Bedingung.* Ohne sie wird jede Benutzung der Methode sicher verlorene Mühe sein. Wegen der Schwerlöslichkeit des Tripalmitins und Tristearins in kaltem Alkohol bedienten sich *Bing* und *Heckscher* bei entsprechenden Versuchsreihen mit diesen Substanzen einer Vermischungstemperatur von 50 bis 60°. Sie zeigten nun, daß Trioleinsuspensionen bei einer Mischungstemperatur von 50 bis 60° denselben Trübungsgrad aufweisen, als wenn die Lösungen vor der Vermischung in „rinnendem Wasser" abgekühlt wurden. Daraus ziehen sie den Schluß, daß die Temperatur auch für den Trübungsgrad der Tripalmitin- und Tristearinsuspensionen belanglos ist. Die Nichtberechtigung dieses Schlußsatzes geht aus meinen oben angeführten Temperaturversuchen hervor.

Zeit und Temperatur sind aber nur zwei Faktoren, die auf den Trübungsgrad einwirken können. Andere von *Bing* und *Heckscher* anscheinend nicht studierte Faktoren sind z. B. die Einlaufgeschwindigkeit der $BaCl_2$-Lösung bei der Präzipitation und die Intensität der darauf folgenden Umschüttlung. Auf eine experimentelle Prüfung dieser Faktoren bin ich nicht eingegangen.

In meiner früheren Kritik machte ich (ohne Kommentare) die Bemerkung, daß das Reproduzieren der Standardserie von *Bing* und *Heckscher* nach der gegebenen Beschreibung nicht möglich war. Diese Behauptung wird von den Autoren kräftig zurückgewiesen. Ich finde mich daher veranlaßt, hier den näheren Grund meiner genannten Bemerkung mitzuteilen. In ihrer ersten Mitteilung gaben die Autoren an, daß die Standardserie so eingestellt war, daß das Rohr mit dem n. W. = 1,00 0,500 g Kaolin auf 1890 ccm Dispersionsmittel enthielt, daß dieses Rohr dieselbe Trübung

wie eine Bariumsulfatsuspension, hergestellt aus 2,50 ccm 1 proz. $BaCl_2$-Lösung durch Zusatz von 0,50 ccm n/200 H_2SO_4, hatte, und weiter, daß ein n. W. der Skala von 0,33 einer Menge von 0,136 mg von A. Amygdale, Milchfett oder Blutfett entspräche. Ein Reproduzieren des Standards war nun deshalb unmöglich, weil einerseits Kaolinpulver eine Handelsware ist, hinsichtlich der man nicht sicher sein kann, daß es überall denselben Dispersitätsgrad besitzt und anderenteils die Herstellung der $BaCl_2$- und Fettsuspensionen nicht genügend präzisiert war. In diesem Zusammenhang soll auch hervorgehoben werden, daß in der ersten Publikation der Autoren nichts darüber berichtet wurde, ob es experimentell festgestellt war, daß der Trübungsgrad der verschiedenen „Fett"-suspensionen der Konzentration der trübenden Substanz proportional war, oder ob der Standard gegen reine Fettsuspensionen geeicht werden mußte. (Offenbar war damals das Cholesterin in dieser Hinsicht nicht geprüft worden.)

Aus den in der späteren Publikation mitgeteilten Versuchsserien scheint hervorzugehen, daß wenigstens für die Cholesterin-, Tripalmitin- und Tristearinsuspensionen zwischen Trübungsgrad und Konzentration der trübenden Substanz einfache Proportionalität besteht. In bezug auf das Triolein bleibt man dagegen etwas unsicher. In der mitgeteilten Serie findet man nämlich, daß mit steigender Trioleinkonzentration die durch Vergleich mit dem Standard gefundenen Werte mit bzw. $+50$, $+33$, $+13$, $+25$, $+40$, $+33$, $+25$, $+10$, $+10$, ± 0, -6, -3, ± 0, -13 Proz. von den verwendeten Mengen abweichen. Dieser deutliche „Gang" kann kaum auf Zufälligkeiten beruhen. Dagegen ist es möglich, daß er nicht auf verschiedener Teilchengröße bei den verschiedenen Konzentrationen beruht, sondern darauf, daß die Ablesung im Nephelometer mit steigendem Zeitabstand von der Präzipitation ausgeführt worden ist. Zur Rechtfertigung der Methode gehört auch eine Entscheidung dieser Frage. (Wegen der kleinen absoluten Mengen in den Fällen der größten prozentuellen Abweichungen spielt diese Frage in praktischer Hinsicht vielleicht doch keine größere Rolle.)

Nach Obenstehendem muß der diskutierten Methode offenbar fortwährend eine erhebliche Unsicherheit zugeschrieben werden. Anspruch auf wissenschaftliche Exaktheit kann sie erst dann stellen, wenn alle Faktoren, die auf den Trübungsgrad einwirken, systematisch und sorgfältig durchgeprüft worden sind.

Eine gemeinsame nephelometrische Bestimmung von so verschiedenen Substanzen wie Neutralfette und Cholesterin erscheint schon von vornherein nicht besonders aussichtsvoll. Und wenn sich dies auch mit genügender Sicherheit ausführen lassen würde, so muß man sich darüber im klaren sein, daß das, was man bestimmt, eine Summe von zwei biologisch keineswegs gleichwertigen Substanzgruppen ist, eine Summe, die daher nur unter ganz speziellen Bedingungen von bestimmterem Interesse sein kann. Tatsächlich läßt sich ja auch die Trennung von Cholesterin und Neutralfett ziemlich bequem durchführen (siehe z. B. *Bang*, *Blix*, l. c.). Insbesondere scheint mir ein nephelometrisches Verfahren zur Mikrobestimmung des freien und gebundenen Cholesterins große Aussichten zu bieten.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß bei der Ausarbeitung der nephelometrischen Methode von *Bing* und *Heckscher* zur Bestimmung des „primären Ätherextraktes“ des Blutes die verschiedenen Faktoren, die auf den Trübungsgrad der Suspensionen einwirken, nicht hinreichend durchgeprüft worden sind, und daß die genannte Methode daher in ihrer jetzigen Form unzuverlässig ist. Es wird darauf hingewiesen, daß das nephelometrische Verfahren sich wahrscheinlich viel besser zur Bestimmung der einzelnen Blutlipoide als zur gemeinsamen Bestimmung von Gruppen der Lipoide oder der Totallipoide des Blutes eignet.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 91.

Fortgesetzte Untersuchungen über den respiratorischen Stoffwechsel bei Arbeit in seiner Beziehung zu den Drüsen mit innerer Sekretion.

Von

George M. Curtis.

Medical Fellow of the National Research Council, Chicago.

[Aus dem physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 3. November 1925.)

2. Der Arbeitsgaswechsel nach Schilddrüsenfütterung.

In einer voraufgehenden Arbeit[1]) hatte ich über Untersuchungen des Arbeitsgaswechsels an Ratten mit Hilfe des von *Asher* konstruierten Arbeitsapparats für Ratten berichtet. In derselben war auch der Plan entwickelt, den Gaswechsel bei Arbeit für Fragestellungen aus der Lehre der inneren Sekretion zu verwerten. Die nachfolgende Arbeit berichtet über die Wirkung von Fütterung von Schilddrüsenpräparaten auf den Gaswechsel bei Muskeltätigkeit. Die Untersuchungen wurden an zwei hierfür besonders geeigneten Ratten ausgeführt. Dieselben waren 2 Monate lang vor Beginn der Versuche mit einer aus Brot und Milch gemischten Diät genährt worden und waren gesunde, normale Tiere. Sowohl ihr normaler Grundumsatz, sowie ihr Nüchternumsatz während normaler Arbeit waren vorher bestimmt worden. Die näheren Angaben befinden sich in meiner voraufgehenden Arbeit.

Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen gehalten und erhielten täglich 35 cg Schilddrüsenextrakt von Burroughs, Wellcome & Cie. mit Hilfe der Schlundsonde. Die Versuche wurden am fünften Tage nach Einsetzen der Schilddrüsenernährung begonnen. Die Fütterungstage sind in den Protokollen angegeben.

Diese Art der Ernährung erwies sich nicht als eine günstige, wie sich in meinen Vorversuchen ergab, wo drei Tiere während der Er-

---

[1]) *George M. Curtis*, diese Zeitschr. **164**, 109, 1925.

nährungsperiode starben und eines bald nach dem Aussetzen der Schilddrüsenzufuhr. Die Sektion ergab keinen pathologischen Befund. Symptomatisch zeigten die Tiere Zeichen von Hyperthyreose infolge von zu viel Schilddrüsenzufuhr. In späteren Versuchen fand ich, daß es ratsamer sei, den Tieren während 3 Tagen 35 cg täglich zu geben und dann die Wirkung durch kleinere tägliche Dosen von nur 14 oder nur 7 cg täglich aufrecht zu erhalten. Es erwies sich auch als vorteilhafter, den Extrakt mit angefeuchtetem Brot verrieben zu reichen. Er wird auf diese Weise leichter eingenommen. Die langsamere Aufnahme und die Vermeidung der Schlundsonde schien auch eher günstiger zu sein.

Es wurde der Gaswechsel sowohl während der Ruhe wie auch während der Arbeit im Verlauf der Periode der Schilddrüsenfütterung bestimmt. Die bekannte Wirkung der Schilddrüsenfütterung auf die Erhöhung des Grundumsatzes ließ sich beobachten. Die Kohlensäurebildung der beiden Tiere vermehrte sich um 36,7 Proz., der Sauerstoffverbrauch erhöhte sich um 36,9 Proz. Der respiratorische Quotient blieb praktisch derselbe wie in der Zeit der Ermittlung des normalen Grundumsatzes. Beide Tiere verloren während der Schilddrüsenzufuhr an Körpergewicht.

Der durchschnittliche Gewichtsverlust pro Stunde und die Wassermenge, die bei beiden Tieren pro Stunde gebildet und gesammelt wurde, waren größer als in der Periode der Bestimmungen des entsprechenden Grundumsatzes in der Normalperiode. Was die Bedeutung der Kondensation des Wassers in dem Apparat betrifft, so habe ich in meiner voraufgehenden Arbeit die erforderlichen Angaben über deren Bedeutung und Einschätzung gemacht.

Die Bestimmungen des Umsatzes während der Arbeitsperiode wurden in ähnlicher Weise angestellt, wie in meiner früheren Arbeit. Die Ratte wurde gezwungen, während einer Stunde etwa 1 km Weg in der rotierenden Trommel zurückzulegen. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen finden sich in der nachfolgenden Übersichtstabelle, welche die Durchschnittswerte aus allen Versuchsreihen enthält, die Einzelprotokolle bringe ich als Anhang am Schlusse meiner Arbeit.

Die während der Periode der Schilddrüsenzufuhr ausgeführte Muskelarbeit führt zu einer stark ausgesprochenen Erhöhung des Gaswechsels. Diese Erhöhung ist sogar größer als die Steigerung, welche sich dadurch ergibt, daß man die Erhöhung des Gaswechsels während der normalen Arbeit mit derjenigen addiert, welche durch Schilddrüsenfütterung allein eintritt. Die Werte überschüssiger Kohlensäure wurden auf folgende Weise errechnet. Von der während der Arbeit unter dem Einfluß der Schilddrüsenfütterung gebildeten Menge zog ich die Werte für den normalen Grundumsatz, des Grundumsatzes während der Schilddrüsenfütterung und denjenigen, der während der normalen

Übersichtstabelle.

Ratten A und B.

Arbeitsstoffwechsel nach Schilddrüsenfütterung. Brot- und Milchdiät.

Bezeichnung der Versuchsreihe	Durchschnittsgewicht g	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Respirationsquotient	Zahl der Versuche	CO_2-Überschuß über normalen Grundumsatz Proz.	O_2-Überschuß über normalen Grundumsatz Proz.	CO_2-Überschuß pro kg, pro km und Std. über normalen (3) oder Schilddrüsenfütterungs-Grundumsatz (4)	O_2-Überschuß über das gleiche
				Ratte A.					
1.	222,62	2,514	2,498	0,731	6	—	—	—	—
2.	260,10	3,371	3,346	0,732	3	34,1	33,9	—	—
3.	260,85	3,899	3,578	0,790	11	55,1	43,2	1,470	1,146
4.	263,20	5,409	5,001	0,786	5	115,2	99,7	2,149	1,736
				Ratte B.					
1.	210,53	2,317	2,294	0,734	5	—	—	—	—
2.	193,60	3,228	3,210	0,730	5	39,3	39,9	—	—
3.	243,10	4,036	3,765	0,779	6	74,2	64,1	1,816	1,553
4.	204,85	6,215	5,877	0,767	6	160,6	156,0	2,987	2,780

1. Normale Ruhegrundumsätze.
2. Ruhegrundumsätze nach Schilddrüsenfütterung.
3. Normale Arbeitsbestimmungen im Grundumsatz.
4. Arbeitsbestimmungen nach Schildrüsenfütterung, Grundumsatz.

Arbeit gefunden wurde, ab. Bei den beiden Tieren erhöhte sich die überschüssig gebildete Kohlensäuremenge um 137,9 Proz. über den normalen Grundumsatzwert, um 76,6 Proz. über den Grundumsatz während Schilddrüsenfütterung und um 46,9 Proz. über den bei normaler Arbeit gefundenen Wert.

Auf ähnliche Weise wurde der überschüssige Wert des Sauerstoffverbrauchs bestimmt. Er war bei den beiden Tieren 132,9 Proz. größer als der normale Grundumsatzwert, 65,5 Proz. größer als der Grundumsatzwert in der Periode der Schilddrüsenfütterung und 48,1 Proz. größer als der Betrag während der Arbeit im Normalzustande.

Ich habe den Versuch gemacht, die erhaltenen Versuchsresultate auf einer einheitlichen Grundlage zu berechnen, indem ich die überschüssig gebildete Kohlensäuremenge und die überschüssig verbrauchte Sauerstoffmenge pro Kilo, pro Kilometer und pro Stunde als Überschuß über den Ruhegrundsatz während der Periode der Schilddrüsenfütterung ermittelte. Es ergab sich auf diese Weise, daß die während der Arbeit in der Periode der Schilddrüsenfütterung überschüssig gebildete Kohlensäuremenge um 55,4 Proz. größer war als der entsprechende Überschuß während der Arbeit im normalen Zustande. Unter den zuerst genannten Bedingungen war der überschüssig verbrauchte Sauerstoff um 65,1 Proz.

größer als während der Arbeit im normalen Zustande, und zwar bei beiden Tieren.

Der respiratorische Quotient während der Arbeit in der Periode der Schilddrüsenzufuhr ist etwas geringer als derjenige während der Arbeit im Normalzustande. Dementsprechend ist der Sauerstoffbrauch während der Arbeit in der Periode der Schilddrüsenfütterung beträchtlich gesteigert. Es ist jedoch der respiratorische Quotient höher als im Ruheumsatz, eine Tatsache, die auf eine gesteigerte Kohlehydratverbrennung während der Arbeitsperiode hinweist.

Eine andauernde Schilddrüsenfütterung ließ die Arbeit der Tiere unregelmäßiger werden. Sie waren in ihrem Bestreben, das gleichmäßige, kontinuierliche Laufen zu umgehen, viel beharrlicher, und sie liefen auch manchmal viel rascher als es notwendig war. Die Experimente wurden bei Ratte B 3 Wochen lang fortgesetzt. Es erweckt den Anschein, daß die Tiere auf die Wirkung der Arbeit viel lebhafter reagierten, sobald der Schilddrüsenextrakt seinen kumulierenden Effekt entfaltet. Nur in einem Falle, im ersten Experiment an Ratte B am fünften Tage der Fütterung, war der Gaswechsel geringer als bei der Arbeit im Normalzustande. In allen anderen Fällen übertraf die Erhöhung diejenige der Normalperiode.

Das Ergebnis meiner Versuche zeigt, daß die Wirksamkeit des Schilddrüsenextrakts nicht bloß im Grundumsatz, sondern auch im Gaswechsel während der Arbeit sich zeigt. Dies spricht dafür, daß der Arbeitsgaswechsel gleichfalls ein Kriterium für den veränderten Zustand eines Tieres infolge der Zufuhr von Schilddrüsen abgibt. Wenn wir den Zustand, in den die Ratten durch Schilddrüsenfütterung geraten, als Hyperthyreose bezeichnen, so besagen die von mir gefundenen Tatsachen, daß ein hyperthyreotisches Tier die gleiche Arbeit weniger ökonomisch ausführt als ein normales Tier, denn sein Gaswechsel ist erheblich gesteigert. Zu betonen ist dabei, daß die Steigerung weit diejenige übertrifft, welche die Schilddrüsenfütterung am Ruhegrundumsatz herbeiführt. Man kann in den Ergebnissen meiner Versuche auch einen neuen Beweis für den erhöhten Sauerstoffbedarf hyperthyreotischer Tiere sehen, der ja schon mit anderen Methoden mit Sicherheit erbracht worden ist. Es scheint aber mit Rücksicht darauf, daß die Beziehungen zwischen Gaswechsel und einer gemessenen Arbeit untersucht wurden, richtiger zu sein, mehr Nachdruck darauf zu legen, daß diese Arbeit unter dem Einfluß der Schilddrüsenzufuhr unökonomischer ausgeführt wird.

Meine Versuchsergebnisse am Tiere stehen in Übereinstimmung mit den interessanten Ergebnissen, welche *Boothby* und *Sandiford*[1])

---

[1]) *W. M. Boothby* und *J. Sandiford*, Journ. Amer. M. Ass. **81**, 795, 1923.

bei ihren Untersuchungen des Arbeitsgaswechsels an Patienten, welche an hyperthyreotischen Erkrankungen litten, gewonnen haben. Ein Krankheitsprozeß am Menschen ist komplexerer Natur als die Versuchsanordnung, welche an sonst normalen Tieren durchgeführt werden kann. Insofern erscheinen die vorstehend mitgeteilten Versuchsergebnisse als aufklärende Stützen der klinischen Befunde nicht ohne Bedeutung zu sein.

Zusammengefaßt, sind die Resultate meiner Arbeit die nachfolgenden:

1. Es wurde der Gaswechsel von Ratten während der Arbeit in einer Periode, wo sie unter dem Einfluß von Schilddrüsenfütterung standen, untersucht.

2. Unter den genannten Bedingungen vermehrt sich bei Laufarbeit im Betrage von durchschnittlich 1 km in der Stunde der Gaswechsel um mehr als 50 Proz. über denjenigen während der Arbeit in einem normalen Zustande.

3. Die Kohlehydratverbrennung ist unter den genannten Bedingungen eher gesteigert.

4. Die reichliche Zufuhr von Schilddrüse hat zur Folge, daß die Arbeit weniger ökonomisch als im normalen Zustande geleistet wird.

Tabelle I.

Ratte A. 1. Grundumsatz. Brot- und Milchdiät nach Schilddrüsenfütterung.

Datum	Tage der Schilddrüsenfütterung	Gewicht der Ratte g	Gewichtsverlust g	Gebildetes Wasser	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch
16. I.	6	282,0	1,140	1,090	3,375	3,325
20. I.	10	257,2	1,490	1,550	3,400	3,460
22. I.	12	241,2	1,380	1,300	3,270	3,190

Fortsetzung.

CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Überschüssige CO_2 pro kg und Stunde über den Grundumsatz	Überschuß der CO_2 Proz.	Überschüssiger O_2 pro kg und Stunde über den Grundumsatz	Überschuß des O_2 Proz.	Respirationsquotient	Dauer der Versuche	Temperatur
3,419	3,368	0,905	36,0	0,870	34,8	0,737	3,5	18,0°
3,305	3,363	0,791	31,5	0,865	34,6	0,714	4,0	17,8
3,389	3,306	0,875	34,8	0,808	32,4	0,745	4,0	17,6
Durchschnitt:								
3,371	3,346	0,857	34,1	0,848	33,9	0,732	.	

Tabelle II.

Ratte A. 2. Arbeitsstoffwechsel. Grundumsatz nach Schilddrüsenfütterung.

Datum	Tage der Schilddrüsenfütterung	Gewicht g	Gewichtsverlust g	Gebildetes Wasser	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Respirationsquotient	Dauer d. Versuchs Stunden
15. I.	5	290,7	0,510	0,410	1,480	1,380	5,091	4,747	0,779	1
17. I.	7	274,6	0,670	0,560	1,420	1,310	5,171	4,771	0,787	1
19. I.	9	265,1	0,480	0,360	1,490	1,370	5,621	5,168	0,790	1
21. I.	11	249,3	0,580	0,475	1,370	1,265	5,495	5,074	0,787	1
23. I.	13	236,4	0,530	0,430	1,340	1,240	5,668	5,245	0,785	1
						Durchschnitt:	5,409	5,001	0,786	1

Fortsetzung.

Temperatur	CO_2-Überschuß pro kg u. Std. üb. normalen Grundumsatz	CO_2-Überschuß pro kg u. Std. über normalen Grundumsatz Proz.	CO_2-Überschuß pro kg und Std über Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung	CO_2-Überschuß bei Schilddrüsenfütterung Proz.	CO_2-Überschuß pro kg und Std. über normalen Arbeitsumsatz	CO_2-Überschuß pro kg und Std. über normalen Arbeitsumsatz Proz.	O_2-Überschuß pro kg und Std. über normalen Grundumsatz	O_2-Überschuß pro kg und Std. über normalen Grundumsatz Proz.	O_2-Überschuß pro kg und Std. über Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung	O_2-Überschuß pro kg und Std. über Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung Proz.
18,4	2,577	102,5	1,720	51,0	1,192	30,6	2,249	90,0	1,401	41,9
17,8	2,657	105,7	1,800	53,4	1,282	32,8	2,273	90,9	1,425	42,6
18,0	3,107	123,6	2,250	66,8	1,732	44,4	2,670	106,9	1,822	54,5
19,0	2,981	118,6	2,124	63,0	1,606	40,3	2,576	100,8	1,728	51,6
18,4	3,154	125,5	2,297	68,1	1,779	45,6	2,747	110,0	1,899	56,8
					Durchschnitt:					
—	2,895	115,2	2,096	60,5	1,518	38,9	2,509	99,7	1,655	49,5

Fortsetzung.

O_2-Überschuß pro kg und km und Std. über normal. Arbeitsumsatz	O_2-Überschuß pro kg und Std. über normal. Arbeitsumsatz Proz.	CO_2 pro kg u. km u. Std. über Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung	Steigerung hiervon über normalen Arbeitsumsatz Proz.	Erhöhung über diejenige bei normaler Arbeit und normalem Umsatz	O_2 pro kg und km und Std. über Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung	Steigerung über normale Arbeit bei normal. Arbeitsumsatz Proz.	Erhöhung über normale Arbeit bei normalem Grundumsatz	Umdrehungen der Trommel	Zurückgelegter Weg m	Art der Arbeit
1,169	32,6	1,792	21,9	0,322	1,460	27,4	0,314	1535	959,6	Unregelmäßig
1,193	33,3	1,901	29,3	0,431	1,505	31,3	0,359	1515	947,1	„
1,590	44,4	2,439	65,9	0,969	1,930	68,4	0,784	1510	944,0	„
1,496	41,8	2,206	50,1	0,736	1,795	56,6	0,649	1540	962,8	Regelmäßig
1,667	46,6	2,409	63,9	0,939	1,992	73,8	0,846	1525	953,4	Unregelmäßig
					Durchschnitt:					
1,423	39,8	2,149	46,2	0,679	1,736	51,5	0,590	1525	953,4	Unregelmäßig

Tabelle III.

Ratte B. Stoffwechselversuche.

2. Grundumsatz. Brot- und Milchdiät nach Schilddrüsenfütterung.

Datum	Tage der Schilddrüsenfütterung	Gewicht der Ratte g	Gewichtsverlust g	Gebildetes H_2O	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch
20. I.	10	216,29	1,745	1,745	2,510	2,510
23. I.	13	190,60	1,680	1,650	2,100	2,070
28. I.	18	193,45	2,855	2,800	3,670	3,615
29. I.	19	183,42	2,150	2,105	2,750	2,705
30. I.	20	190,49	2,260	2,325	3,420	3,485

Fortsetzung.

CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Überschüssige CO_2 über den normalen Grundumsatz pro kg und Stunde	Überschüssige CO_2 über den normalen Grundumsatz Proz.	Überschüssiges O_2 über den normalen Grundumsatz pro kg und Stunde	O_2-Überschuß über den normalen Grundumsatz Proz.	Respirationsquotient	Versuchsdauer	Temperatur
3,316	3,316	0,999	43,1	1,022	44,6	0,726	3,5	18,0
3,673	3,620	1,356	58,5	1,326	57,8	0,737	3,0	17,9
3,162	3,115	0,845	36,5	0,821	35,8	0,737	6,0	17,8
2,999	2,950	0,682	29,4	0,656	28,6	0,739	5,0	19,0
2,992	3,049	0,675	29,1	0,755	32,9	0,713	6,0	19,0
Durchschnitt:								
3,228	3,210	0,911	39,3	0,916	39,9	0,730		

Tabelle IV.

Ratte B. Stoffwechselversuche.

2. Arbeitsstoffwechsel. Grundumsatz nach Schilddrüsenfütterung.

Datum	Tage der Schilddrüsenfütterung	Gewicht der Ratte g	Gewichtsverlust g	Gebildetes Wasser	Gebildetes CO_2	Verbrauchter O_2	CO_2 pro kg u. Std.	O_2 pro kg u. Std.	Respirationsquotient	Versuchsdauer Stunden
15. I.	5	242,50	0,37	0,345	1,095	1,070	4,515	4,412	0,743	1
19. I.	9	221,10	0,53	0,440	1,345	1,255	6,083	5,676	0,779	1
22. I.	12	209,51	0,49	0,430	1,305	1,245	6,229	5,943	0,761	1
24. I.	14	196,50	0,38	0,290	1,225	1,135	6,234	5,776	0,784	1
28. I.	18	188,64	0,66	0,610	1,320	1,240	6,998	6,573	0,773	1
31. I.	21	170,72	0,57	0,510	1,235	1,175	7,234	6,883	0,764	1
					Durchschnitt:		6,215	5,877	0,767	—

Fortsetzung.

Temperatur	Überschüssige CO_2 pro kg und Std. über den Grundumsatz	Überschuß des CO_2 pro kg und Std. über den Grundumsatz Proz.	Überschüssige CO_2 pro kg und Std. über den Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung	Überschüss. CO_2 pro kg u. Std. üb. Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung Proz.	Überschüssige CO_2 pro kg u. Std. über den norm. Arbeitsgrundumsatz	Überschüss. CO_2 pro kg u. Std. üb. d. norm. Arbeitsgrundumsatz Proz.	Überschüssiger O_2 pro kg und Std. über den normalen Grundumsatz	Überschüss. O_2 pro kg u. Std. üb. den normalen Grundumsatz Proz.	Überschüssiger O_2 pro kg und Std. über den Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung	Überschüss. O_2 pro kg u. Std. üb. d. Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung Proz.
18,0	2,197	94,8	1,287	39,9	0,479	11,9	2,118	92,3	1,202	29,7
18,2	3,766	162,5	2,855	88,4	2,047	49,6	3,382	147,4	2,466	76,8
19,0	3,912	168,8	3,001	93,0	2,193	54,3	3,649	159,1	2,733	85,1
17,0	3,917	173,0	3,006	93,1	2,198	54,5	3,482	150,1	2,566	79,9
18,0	4,681	202,0	3,777	116,8	2,962	73,4	4,279	186,5	3,376	104,8
18,0	4,917	212,2	4,006	124,1	3,198	79,2	4,589	200,0	3,673	114,4
Durchschnitt:										
—	3,898	160,6	2,988	92,6	2,180	54,8	3,583	156,0	2,667	81,5

Fortsetzung.

Überschüssiger O_2 pro kg und Std. über den normalen Arbeitsgrundumsatz	Überschüss. O_2 pro kg u. Std. üb. d. norm. Arbeitsgrundumsatz Proz.	CO_2 pro kg u. km u. Std. über d. Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung	Überschuß der CO_2 bei normaler Arbeit über normalen Grundumsatz Proz.	Menge d. Überschusses der CO_2 bei normaler Arbeit über den normalen Grundumsatz	O_2 pro kg u. km u. Std. über d. Grundumsatz bei Schilddrüsenfütterung	Überschuß des O_2 bei normaler Arbeit über den normalen Grundumsatz Proz.	Menge d. überschüss. O_2 bei normaler Arbeit über den Grundumsatz	Umdrehungen der Trommel	Zurückgelegte Distanz m	Art der Arbeit
0,647	17,2	1,287	−29,1	−0,529	1,282	−17,5	−0,271	1500	937,8	Regelmäßig
1,911	50,8	2,855	57,2	1,039	2,465	58,7	0,912	1600	1000,0	Unregelmäßig
2,178	57,9	3,001	65,3	1,185	2,857	82,1	1,304	1530	956,5	Regelmäßig
2,011	53,4	3,006	65,5	1,190	2,718	75,0	1,165	1510	944,0	Unregelmäßig
2,808	74,6	3,770	108,6	1,954	3,505	125,7	1,952	1535	959,6	„
3,118	84,8	4,006	120,6	2,190	3,853	148,1	2,300	1525	953,3	„
Durchschnitt:										
2,112	56,4	2,987	64,5	1,171	2,780	78,7	1,227	1533	958,5	Unregelmäßig

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 92.

Über die Beziehungen des Blutkochsalzspiegels zur Diurese.

Von

Adolf Hartwich (Halle a. d. S.).

[Aus dem physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 3. November 1925.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

I. Experimenteller Teil.

Curtis hat unter *Asher* die unter dem Einfluß der spezifischen Diuretica bei der Diurese auftretenden Vorgänge studiert und gefunden, daß das erste, was nach Injektion des Diureticums Euphyllin beim Kaninchen geschieht, ein rapider Chloranstieg im Blute ist. Er schließt hieraus, daß die Wirkung der spezifischen Diuretica im wesentlichen dadurch zustande kommt, daß zwischen Gewebe und Blut eine Änderung, speziell eine rasche Veränderung im Chlorgehalt des Blutes eintritt. *Curtis* vermißte in den Fällen, in denen auf Euphyllininjektion die Diurese ausblieb, auch den Chloranstieg im Blute. Daher vermutete er einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Chloranstieg im Blute und der Diurese. Durch eine große Reihe von Versuchen bewies er dann, daß bei Ablenkung der Blutchloride durch intraperitoneale Injektion von leichthypotonischer oder isotonischer Rohrzuckerlösung die Diurese auf Euphyllininjektion wesentlich kleiner war. Die „Restdiurese“, d. h. die über die Norm noch übrigbleibende Diurese in diesen Fällen konnte er auf den Eintritt von Zucker in die Blutbahn zurückführen.

Die Weiterführung der sich an diese Befunde anschließenden Probleme veranlaßte mich zu einer Reihe von Versuchen, die im folgenden mitgeteilt werden sollen.

Einer ersten Versuchsreihe wurde die Überlegung zugrunde gelegt, ob auch ohne Diureticum eine Diurese zustande kommt, wenn es gelingt, einen Anstieg der Blutchloride herbeizuführen. (Ist es nämlich nur

das Chlor, das die Diurese bedingt, so wäre zu erwarten, daß allein sein Anstieg schon Diurese herbeiführt.) Es wurde versucht, durch *intraperitoneale* Infusion von 100 ccm hypertonischer NaCl-Lösung (1,5 proz.) einen Anstieg der Chloride und Diurese zu erzeugen.

Die Technik war dabei die, daß das Versuchstier (es wurden nur männliche Kaninchen benutzt) aufgebunden und die Körperwärme durch Glühlampen gleichmäßig gehalten wurde. Die Blase wurde durch Katheterisieren entleert und dann die langsame Infusion der körperwarmen Lösung vorgenommen. Der Katheter blieb in der Blase liegen, und es wurden die 10-Minuten-Portionen gemessen. Gleichzeitig wurden in denselben Zeitabständen die Blutchloride und in den einzelnen Harnportionen die Chloride nach *Bang* bestimmt. In Abständen von 30 Minuten wurde das Hämoglobin nach der *Sahli*schen Methode gemessen. Außerdem wurde die spezifische Leitfähigkeit der einzelnen 10-Minuten-Portionen und in einzelnen Fällen die Gefrierpunktserniedrigung festgestellt. Rechnerisch wurde die molekulare Gesamtkonzentration und die auf Kochsalz bezogene molekulare Konzentration ermittelt. Nach Beendigung des Versuchs wurde regelmäßig die infundierte Flüssigkeit auf ihren Chlorgehalt untersucht. Die Tiere erhielten am Vortage des Versuchs feuchtes Futter (Äpfel, Rüben, Gras).

Die ersten Versuche mit intraperitonealer Infusion von 100 ccm 1,5 proz. NaCl-Lösung ergaben trotz Anstieg des Blutchlors bezüglich der Diurese ein vollkommen negatives Resultat. Ich gebe in Tabellenform einen Versuch aus einer ganzen Anzahl ähnlich verlaufener wieder (Tabelle I).

Tabelle I.

Versuch 3. 8. Mai. Weißes Kaninchen, Gewicht 3350 g. 100 ccm 1,5 proz. NaCl-Lösung intraperitoneal.

Zeit	Blut-NaCl Proz.	Harn-NaCl Proz.	Harnmenge	Hämoglobinblut Proz.	Zeit	Blut-NaCl Proz.	Harn-NaCl Proz.	Harnmenge	Hämoglobinblut Proz.
Vor dem Versuch	0,50	0,24	0,3	72	70′	0,52	—	0,5	—
					80	0,53	1,16	0,4	86
10 Min. nach der Infusion	0,50	0,24	0,3	—	90	—	—	0,4	—
20′	0,53	0,27	0,15	—	100	0,52	1,41	0,3	82
30	0,53	0,43	0,5	80	110	—	1,48	0,2	—
40	0,54	—	0,3	—	120	0,48	—	0,2	—
50	0,51	0,45	0,1	—	130	—	1,63	0,4	82
60	—	0,77	0,4	—	140	0,48	1,30	1,0	—

Man sieht aus der Tabelle, daß kurze Zeit nach der Infusion das Blutkochsalz ansteigt, während die Harnmenge — abgesehen von geringen Schwankungen — sich nicht ändert. Auch das Bluthämoglobin steigt an, so daß man daran denken könnte, daß sowohl die NaCl- wie die Hämoglobinzunahme eine Eindickung des Blutes anzeigen. Diese Annahme gewinnt noch mehr an Sicherheit durch das Ergebnis der

NaCl-Bestimmung in der Bauchhöhlenflüssigkeit; der NaCl-Gehalt in dieser war von 1,5 auf 0,9 Proz. gesunken. Man muß also annehmen, daß es zu einem Wassereinstrom aus dem Blute in die Bauchhöhlenflüssigkeit gekommen war, und könnte daran denken, daß der Wasserentzug aus der Blutbahn für die Diurese vielleicht ein wirksamerer, *hemmender* Faktor als der NaCl-Anstieg ein *begünstigender* Faktor ist. Daher wurde versucht, den Wasserverlust durch Zufuhr von Wasser per Klysma zu ersetzen. An denselben Tieren wurde einmal die Diurese allein nach Klysma, ein anderes Mal nach Klysma und intraperitonealer hypertonischer Kochsalzinfusion beobachtet.

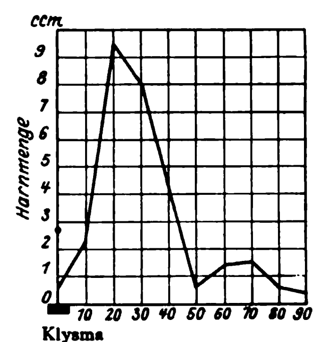


Abb. 1. Versuch 23. 20. VI. Schwarzes Kaninchen. Gewicht 2700 g. 80 ccm Wasser per Klysma

Kurve 1 und 2 geben zwei derartige Versuche wieder.

Man sieht in Kurve 1 den steilen Anstieg und baldigen Abfall der Diurese auf die durch Klysma erfolgte Wasserzufuhr. In Kurve 2

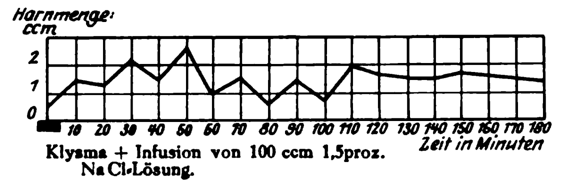


Abb. 2. Versuch 24. 22. VI. Schwarzes Kaninchen. Gewicht 2700 g. 100 ccm 1,5 proz. NaCl-Lösung. Gleichzeitig 80 ccm Wasser per Klysma.

Tabelle II.

Versuch 20. 23. Juni. Weißes Kaninchen, Gewicht 2500 g. 100 ccm 1,5 proz. NaCl-Lösung intraperitoneal, gleichzeitig 80 ccm Wasser per Klysma.

Zeit	Blut-NaCl Proz.	Harn-NaCl Proz.	Harnmenge	Hämoglobinblut Proz.	Zeit	Blut-NaCl Proz.	Harn-NaCl Proz.	Harnmenge	Hämoglobinblut Proz.
Vor dem Versuch	0,51	0,31	0,5	62	120′	—	—	1,0	—
					130	0,55	—	1,2	—
10 Min. nach der Infusion	0,53	0,53	0,6	—	140	—	0,69	1,8	—
20′	0,54	—	1,5	—	150	0,54	—	1,7	62
30	0,54	—	0,3	59	160	—	—	2,5	—
40	0,54	0,45	0,6	—	170	0,56	0,50	2,2	—
50	0,54	—	0,7	—	180	0,56	0,50	2,8	—
60	0,55	—	1,0	60	190	0,56	0,40	2,5	—
70	—	0,38	0,7	—	200	—	0,60	2,2	—
80	0,56	—	0,4	—	210	—	0,53	2,8	—
90	—	—	0,4	—	220	—	0,45	3,6	—
100	0,54	0,58	1,5	63	230	0,57	0,30	4,0	58
110	0,56	—	0,7	—	240	—	0,30	4,0	—

erkennt man das Ausbleiben dieser Zacke und sieht, daß die Diuresekurve in die Länge gezogen ist. Einen genauen Einblick in die Blut- und Harnchlorwerte bei einem solchen Versuch gibt Tabelle II.

Sie zeigt, daß die Blutchloride ansteigen und obwohl anscheinend genügend Wasser dem Körper zur Verfügung steht, doch nur eine sehr geringe, und zwar stark protrahierte Diurese eintritt. Etwa 1½ Stunden nach Versuchsbeginn setzt ein Steigen der Harnmenge ein; die Zunahme hält bis Ende des Versuchs an. Die absoluten Mengen sind in der vierten Stunde am größten. Der NaCl-Gehalt der Bauchhöhlenflüssigkeit betrug nach 4 Stunden 0,7 Proz.

Das Ausbleiben der Diurese bei intraperitonealer NaCl-Infusion und gleichzeitiger Wasserzuführung per Klysma wird man sich so erklären müssen, daß das Wasser zur Herbeiführung der Isotonie der hypertonischen Kochsalzlösung benutzt wurde. Nachdem diese isotonisch geworden ist, tritt die Resorption und mit ihr die Diurese ein, deren spätes Einsetzen damit erklärt ist.

Die Ergebnisse dieser Versuche führten dazu, den NaCl-Gehalt der Infusionslösung herunterzusetzen. Tabelle III gibt einen derartigen Versuch wieder.

Tabelle III.

Versuch 18. 15. Juni. Schwarzes Kaninchen, Gewicht 2500 g. 100 ccm 1,25proz. NaCl-Lösung intraperitoneal.

Zeit	Blut-NaCl Proz.	Harn-NaCl Proz.	Harnmenge	Hämoglobinblut Proz.	Zeit	Blut-NaCl Proz.	Harn-NaCl Proz.	Harnmenge	Hämoglobinblut Proz.
Vor dem Versuch	0,48	0,29	0,7	86	110′	0,46	0,51	0,7	—
10 Min. nach der Infusion	0,47	0,29	0,7	—	120	0,48	0,49	3,5	—
20′	0,47	0,35	0,4	—	130	0,50	0,50	2,6	—
30	0,47	0,26	2,0	86	140	—	—	1,3	—
40	0,46	0,65	2,0	—	150	0,52	0,57	1,5	—
50	0,48	1,27	1,4	—	160	—	0,57	2,0	—
60	0,48	0,84	1,0	88	170	0,54	0,57	1,6	—
70	—	0,55	0,6	—	180	—	0,50	2,3	—
80	0,46	0,44	0,6	—	190	0,54	0,50	2,0	92
90	0,46	0,53	1,3	88	200	—	0,53	2,0	—
100	0,47	—	0,7	—	210	0,54	—	2,4	—

Das Ergebnis dieses Versuches unterscheidet sich in mancher Hinsicht von den Vorhergehenden, so vor allem im Ausbleiben des Chloranstiegs im Blute. Trotz des Gleichbleibens der Blutchloride setzt doch eine Diurese ein, die an Mengen der einzelnen Portionen nicht hinter der in den entsprechenden Versuchen zurücksteht. Die gegen Ende des Versuchs auftretende Zunahme der Blutchloride kann im Zusammenhang mit der Hämoglobinzunahme wohl nur als Bluteindickung aufgefaßt werden.

Die Deutung dieser Versuche ist wohl so, daß infolge des geringeren NaCl-Gehalts der Infusionslösung eine schnellere Resorption stattgefunden hat. Der vermehrte Wassergehalt des Blutes war dann hier die Ursache für die Diurese.

Nachdem die vorhergehenden Versuche die Vermutung nahegelegt hatten, daß der Wasserentzug des Blutes bei intraperitonealer Infusion einer hypertonischen Kochsalzlösung das Zustandekommen der Diurese hemmen könnte, wurde untersucht, wie sich die Diurese verhält, wenn gleichzeitig mit der intraperitonealen Infusion Euphyllin gegeben wird. Kurve 3 zeigt einen derartigen Versuch als ein Beispiel aus vielen.

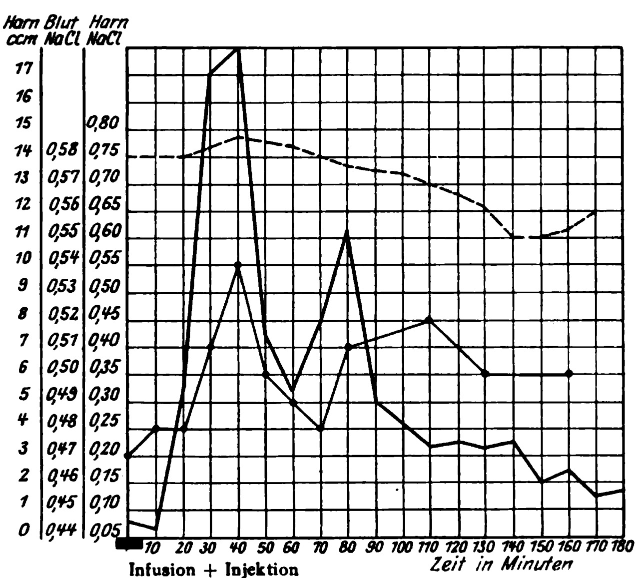


Abb. 3. Versuch 25. 26. VI. Schwarzes Kaninchen. Gewicht 2700 g.
100 ccm 1,5proz. NaCl-Lösung, gleichzeitig 0,122 g Euphyllin intramuskulär.
——— Harnmenge. · —· Blut NaCl. - - - - - Harn NaCl.

Der NaCl-Gehalt der Bauchhöhlenflüssigkeit war nach 3 Stunden auf 0,73 Proz. gesunken, also war auch hier Wasser in die Bauchhöhle eingewandert, und trotzdem sehen wir unter Anstieg des Blut-NaCl eine gewaltige Diurese auftreten. Man kann aus der Kurve einen gewissen Parallelismus zwischen Blut-NaCl und Diurese herauslesen.

(Aus den vorstehend mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß der Chloranstieg allein zur Hervorrufung einer Diurese nicht genügt, da es sehr wohl gelingt, den Blutchlorgehalt zu erhöhen, ohne daß eine stärkere Diurese einsetzt, daher kann auch bei der Euphyllindiurese in dem Chloranstieg des Blutes nicht das alleinige ursächliche Moment für die Diurese erblickt werden. Man könnte höchstens sagen, daß der Chloranstieg im Blute bei der Euphyllindiurese eine unerläßliche Voraus-

setzung zur Wirkung dieses Mittels ist und daß, wenn diese Voraussetzung fehlt, auch die Euphyllindiurese ausbleibt. So ist es zu erklären, daß z. B. *Curtis* in den Fällen, in denen auf Euphyllin keine Diurese auftrat, auch den Chloranstieg vermißte.)

Die Rolle, die die Blutchloride bei der Diurese spielen, wurde weiter studiert an Versuchen mit intraperitonealen Zuckerinfusionen. Hierzu wurden Maltose- bzw. Galaktoselösungen benutzt, und zwar wurde bei demselben Tiere einmal Maltose, einmal Maltose + Kochsalzzusatz verwandt. In beiden Fällen waren die Lösungen isotonisch. Besser als mit Worten werden die hierbei erhaltenen Ergebnisse durch Kurven erläutert.

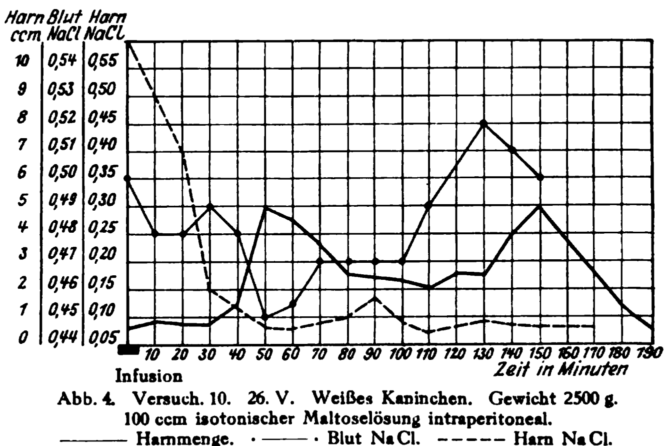


Abb. 4. Versuch. 10. 26. V. Weißes Kaninchen. Gewicht 2500 g. 100 ccm isotonischer Maltoselösung intraperitoneal. ——— Harnmenge. ·——· Blut NaCl. - - - - - Harn NaCl.

Kurve 4 zeigt das Verhalten von Diurese, Blut- und Harnchloriden bei intraperitonealer Infusion von 100 ccm isotonischer Maltoselösung. Die Blutchloride fallen, die Chlorausscheidung im Harn sinkt ebenfalls; das Maximum einer 10-Minuten-Portion beträgt 5 ccm. Gegen Ende des Versuchs kommt es dann zu einem Anstieg der Blutchloride und es ist sehr bemerkenswert, daß auch die Diuresekurve noch einen zweiten Anstieg zeigt. Die Abhängigkeit der Diurese von dem Verhalten des Blut-NaCl ist hier unverkennbar. Die Diuresekurve verläuft der Blutkochsalzkurve vor allem in ihrer zweiten Hälfte annähernd parallel.

Ein ganz anderes Bild zeigt Kurve 5.

Hier erfolgt infolge des Kochsalzgehalts der infundierten Maltoselösung ein Anstieg der Blutchloride und die Diurese steigt bis 13,5 ccm in 10 Minuten. Auch hier kommt es gegen Ende des Versuchs zu einem zweiten mit einem Ansteigen des Blutkochsalzes zeitlich zusammenfallenden geringen Diureseanstieg. Interessant ist, daß beide Kurven das Diuresemaximum zur gleichen Zeit (50 Minuten nach der Infusion) zeigen.

Ich habe die beiden Versuche als Beispiele aus einer größeren Zahl gleichartig verlaufener ausgewählt und bringe, da sie mir zur Erläuterung der Bedeutung der Blutchloride für die Diurese wichtig erscheinen, nähere Einzelheiten, insbesondere über die spezifische Leitfähigkeit, die molekulare Gesamtkonzentration, sowie die auf Kochsalz berechnete Konzentration des Harnes, ferner über das Verhalten des Hämoglobins in Tabelle IV und V.

In Tabelle IV sehen wir gleichzeitig mit der Abnahme des Blut-NaCl ein Sinken des Hämoglobins. Die Blutkochsalzabnahme wird man entweder als Abwandern von NaCl in die kochsalzfreie Infusions-

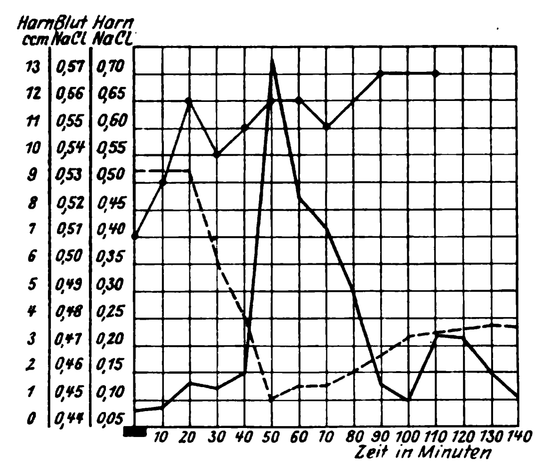


Abb. 5. Versuch 8. 20. V. Weißes Kaninchen. Gewicht 2500 g. 100 ccm isotonischer Maltose-Kochsalzlösung intraperitoneal. ——— Harnmenge. ·—·—· Blut NaCl. - - - - - Harn NaCl.

flüssigkeit oder als Blutverdünnung infolge Resorption der Zuckerlösung auffassen müssen. Für die erste Auffassung spricht, daß die infundierte kochsalzfreie Lösung nach 3 Stunden einen NaCl-Gehalt von 0,50 Proz. aufwies. Für die letztere, die gleichzeitig mit der Hämoglobinabnahme einsetzende Diurese, also ein Zeichen, daß die Zuckerlösung sich bereits in der Blutbahn befand. Mit dem Anstieg des Blut-NaCl erfolgt dann auch wieder eine Erhöhung des Hämoglobingehalts, wobei die Hämoglobinzahl sich auf der Höhe des Ausgangswertes hält (die geringe Differenz zwischen 75 und 77 Proz. liegt innerhalb der Fehlergrenzen), während das Blutkochsalz den Ausgangswert übersteigt, so daß es sich vielleicht um ein Nachströmen von Kochsalz aus dem Gewebe in das Blut handeln könnte. Wenn diese Annahme zutreffen würde, so wäre es immerhin nicht recht erklärlich, warum dem Gewebe Kochsalz entzogen wird, um den Kochsalzgehalt des Blutes über den Normalspiegel zu steigern.

Tabelle IV.

Versuch 10. 26. Mai. Weißes Kaninchen, Gewicht 2500 g. 100 ccm 9,2 proz. isotonischer Maltoselösung intraperitoneal.

Zeit	Blut-NaCl Proz.	Harn-NaCl Proz.	Harn-NaCl g	Spezif. Leit-fähigkeit	Molekulare Gesamt-konzen-tration	Molekul. Konzen-tration NaCl	Gefrier-punkt	Harn-menge	Hämo-globin-blut Proz.
Vor dem Versuch	0,50	0,4	0,0012	—	—	0,06837	Nicht bestimmt	0,3	75
10 Min. nach der Infusion	0,48	—	—	—	—	—		0,6	—
20′	0,48	0,38	0,00076	—	—	0,06495		0,2	—
30	0,49	0,35	0,00175	73,85	0,079002	0,05982		0,5	—
40	0,48	0,15	0,00225	38,55	0,039924	0,02564		1,5	—
50	0,45	0,11	0,0055	—	—	0,01880		5,0	70
60	0,45	0,074	0,003108	51,07	0,054624	0,01264		4,2	—
70	0,47	0,081	0,00307	59,62	0,0634975	0,01384		3,8	—
80	—	0,061	0,00167	54,47	0,0573175	0,01042		2,7	—
90	0,47	0,1	0,0025	—	—	0,01708		2,5	76
100	0,47	0,1	0,0023	44,66	0,038217	0,01708		2,3	—
110	—	0,11	0,0022	—	—	0,01873		2,0	—
120	0,52	0,13	0,00325	33,65	0,034507	0,02222		2,5	77
130	—	—	—	27,26	0,0271957	—		2,4	—
140	0,54	0,08	0,0032	21,67	0,021724	0,01367		4,0	76
150	—	0,06	0,0030	—	—	0,01025		5,0	—
160	0,53	0,06	—	15,73	0,015583	0,01025		3,7	—
170	—	0,07	0,00189	16,54	0,0164139	0,01196		2,7	—
180	0,52	0,12	0,0020	—	—	—		1,5	76

Bauchhöhlenflüssigkeit nach 3 Stunden 0,50 Proz. NaCl.

Tabelle V.

Versuch 8. 20. Mai. Weißes Kaninchen, Gewicht 2500 g. 100 ccm Maltose + NaCl-Lösung (6,7 Proz. Maltose + 0,3 Proz. NaCl) intraperitoneal.

Zeit	Blut-NaCl Proz.	Harn-NaCl Proz.	Harn-NaCl g	Spezif. Leit-fähigkeit	Molekulare Gesamt-konzen-tration	Molekul. Konzen-tration NaCl	Gefrier-punkt	Harn-menge	Hämo-globin-blut Proz.
Vor dem Versuch	0,51	—	—	—	—	—	—	0,4	70
10 Min. nach der Infusion	0,53	0,51	0,000357	—	—	—	—	0,7	—
20′	0,55	0,51	0,00918	105,02	0,11492	0,008854	—	1,8	—
30	0,54	0,36	0,00540	71,20	0,0760	0,0611	—	1,5	70
40	0,55	0,25	0,0050	61,99	0,06575	0,04290	—	2,0	—
50	0,56	0,10	0,0135	34,54	0,046304	0,0186	0,381	13,5	—
60	0,56	0,11	0,00935	26,22	0,026553	0,01948	0,32	8,5	70
70	0,55	0,11	0,00792	25,95	0,026253	0,01948	—	7,2	—
80	—	0,14	0,0070	27,47	0,035494	0,02393	0,51	5,0	—
90	0,57	—	—	—	—	—	—	1,75	—
100	—	—	—	—	—	—	—	1,0	—
110	0,57	0,21	0,00651	46,01	0,073005	0,03589	1,368	3,1	70
120	—	0,11	—	—	—	—	—	3,1	—
130	—	0,22	—	67,23	0,071635	0,03829	—	2,1	—
140	—	0,21	—	—	—	—	—	1,0	—

Bauchhöhlenflüssigkeit nach 140 Minuten 0,90 Proz. NaCl.

Auch die Deutung des Blutkochsalzanstiegs bei gleichbleibendem Hämoglobingehalt in dem durch Tabelle V wiedergegebenen Versuch bereitet einige Schwierigkeit. Man wird auch hier nicht ohne die Annahme eines NaCl-Einstroms aus dem Gewebe in die Blutbahn auskommen können und wird um so mehr zu dieser Annahme geführt, als

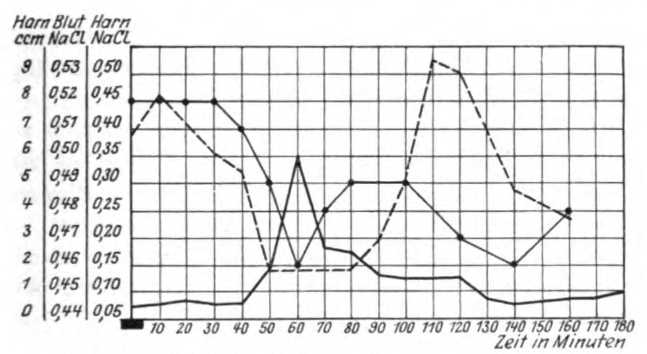


Abb. 6. Versuch 16. 10. VI. Weißes Kaninchen. Gewicht 2500 g. 100 ccm isotonischer Galaktoselösung (4,8 proz.) intraperitoneal.

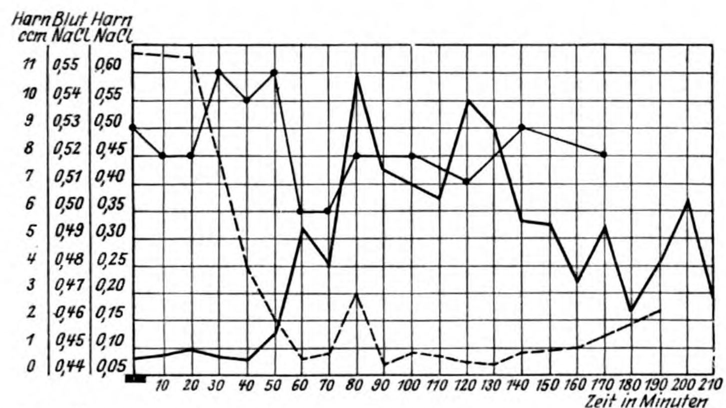


Abb. 7. Versuch 14. 3. VI. Weißes Kaninchen. Gewicht 2500 g. 100 ccm isotonischer Galaktose + NaCl-Lösung intraperitoneal (3,52 proz. Galaktose, 0,3 proz. NaCl). ——— Harnmenge. ·——· Blut NaCl. ----- Harn NaCl.

es außer dem sich während des ganzen Versuchs zeigenden Blutkochsalzanstieg auch noch zu einer Abgabe von Kochsalz an die Infusionsflüssigkeit in der Bauchhöhle kommt (der NaCl-Gehalt war hier in 140 Minuten von 0,3 auf 0,9 Proz. gestiegen).

Daß die in Spalte 4 von Tabelle V wiedergegebenen absoluten Kochsalzmengen, die ausgeschieden wurden, größer waren als die in Tabelle IV, ist infolge des NaCl-Gehalts der Infusionslösung bei dem Versuch in Tabelle V verständlich.

Da wir aus den Arbeiten von *Hamburger* wissen, daß die einzelnen Zuckerarten bezüglich ihres Verhaltens auf die Niere verschieden sind, wurde neben der Maltose als zweite Zuckerart Galaktose untersucht. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse bringe ich in Kurve 6 und 7.

Auch hier wieder in Kurve 6 das Sinken der Blutchloride und die geringe Diuresesteigerung (Maximum einer 10-Minuten-Portion 6 ccm), in Kurve 7 Anstieg der Blutchloride und wesentlich stärkere Diurese (fast das Doppelte wie im vorigen Versuch). Dem ersten Gipfel folgt nach 30 Minuten noch ein zweiter fast ebenso hoher.

In Kurve 4 und 5 fiel das Diuresemaximum zeitlich zusammen (50 Minuten nach Versuchsbeginn), in Kurve 7 liegt es 20 Minuten später als in Kurve 6, obwohl auch hier der erste *wesentlichere* Anstieg zu gleicher Zeit erfolgte (60 Minuten nach Versuchsbeginn).

Vergleicht man die Gesamtmenge des ausgeschiedenen Wassers in derselben Zeitspanne (140 Minuten) in den vier, durch Kurve 4 bis 7 wiedergegebenen Versuchen, so ergibt sich für

Kurve 4	(isotonische Maltoselösung)	36,4 ccm
„ 5	(„ „ , NaCl-Lösung) .	52,7 „
„ 6	(isotonische Galaktoselösung)	24,2 „
„ 7	(„ „ , NaCl-Lösung)	71,3 „

Die Zahlen zeigen deutlich die wesentlich stärkere Diurese in den Fällen mit Kochsalzzusatz. Der Unterschied zwischen Kurve 4 und 5 beträgt nicht ganz 50 Proz., der zwischen Kurve 6 und 7 nahezu das Dreifache, ohne daß, wie die Zahlen den Anschein erwecken könnten, die Diurese bei Galaktoselösungen im allgemeinen eine größere war als bei Maltose, so daß man sagen kann, daß sich keine durchgreifenden Unterschiede zwischen den beiden Lösungen feststellen ließen. Das Verhalten der Blutchloride, der Diurese und der ausgeschiedenen Harnkochsalzmenge war in den entsprechenden Versuchen annähernd gleich; die geringen gefundenen Unterschiede möchte ich den verschiedenen Tieren zuschreiben.

Die Bedeutung des Blutkochsalzspiegels für die Größe der Diurese geht aus diesen Versuchen deutlich hervor, insofern als sein *Hochbleiben nach der Infusion eine starke, sein Sinken eine nur geringe Diurese zur Folge hat.* Weniger scharf sind die Unterschiede, wenn man statt isotonischer Zuckerlösungen hypertonische nimmt. Zu Versuchen mit hypertonischen Zuckerlösungen veranlaßte mich die Überlegung, daß es hierbei

1. zu einer Chloridablenkung,
2. zu einer Wasserablenkung

kommen wird, also zwei Momente, die der Diurese hinderlich sein mußten. Allerdings war hierbei den früheren Versuchen mit isotonischer Zuckerlösung gegenüber die stärkere diuretische Wirkung der konzen-

trierteren Zuckerlösung in Rechnung zu setzen. Und dieser Faktor war in der Tat in den Versuchen der überwiegende, so daß trotz Sinkens der Blutchloride eine relativ sehr große Diurese zustande kam. Kurve 8 gibt einen derartigen Versuch wieder.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist um so bemerkenswerter, als wir aus den Untersuchungen von *Curtis* wissen, daß isotonische Rohrzuckerlösung sogar mit Euphyllin zusammengegeben nur eine sehr geringe Diurese gibt, die *Curtis* aus den antagonistisch wirkenden Einflüssen der Chloridablenkung und des Zuckereinstroms in das Blut erklärte.

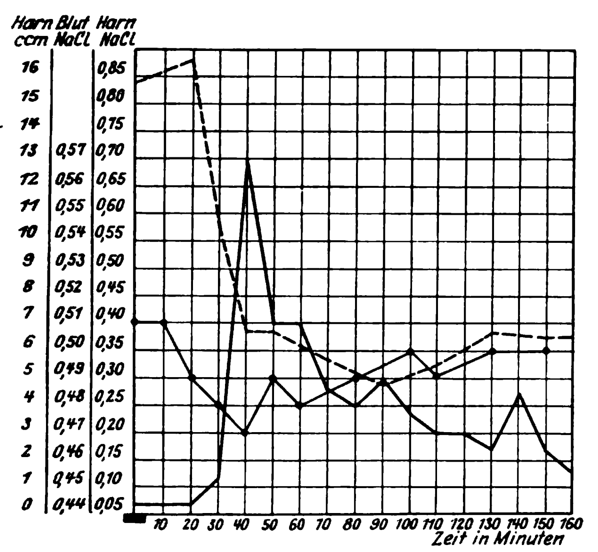


Abb. 8. Versuch 27. 30. VI. Schwarzes Kaninchen. Gewicht 2700 g. 100 ccm hypertonischer Rohrzuckerlösung (15 proz.) intraperitoneal.

Auch die Zusammensetzung des Harnes ließ erkennen, daß es sich um eine Zuckerdiurese handle. Dasselbe dürfte auch für meinen vorliegenden Versuch gelten. Die Chloridablenkung haben wir, wie die Blutkochsalzlinie in Kurve 8 ergibt, auch im vorliegenden Versuch (die Bauchhöhlenflüssigkeit enthielt nach 160 Minuten 0,46 Proz. NaCl). Wenn auch zur Herbeiführung der Isotonie Wasser von Blut an die Bauchhöhlenflüssigkeit abgegeben worden ist, muß es rasch aus dem Gewebe wieder ersetzt worden sein, da sonst die starke Diurese nicht möglich gewesen wäre. Dieser den Wasserverlust in die Bauchhöhle überkompensierende Wassergewinn des Blutes ist natürlich auf den Eintritt des Zuckers aus der hypotonischen Zuckerlösung zurückzuführen. Wenn ich auch keinen Vergleichsversuch mit hypertonischer Zuckerlösung + Kochsalzzusatz habe, so glaube ich annehmen zu dürfen, daß eine wesentliche Steigerung kaum mehr eingetreten wäre, da die Zahl für eine 10-Minuten-

Portion bereits eine der höchsten darstellt, die bei sämtlichen Versuchen gesehen wurden. Aus äußeren Gründen bin ich leider auch nicht mehr zu Versuchen mit hypertonischer Zuckerlösung + Euphyllin gekommen.

Die Ausscheidung des intraperitoneal beigebrachten Zuckers im Harne setzte jedesmal mit der ersten vermehrten Harnportion ein. Sämtliche Kurven zeigen vor dem Diuresemaximum eine kleinere Erhebung (meist etwa 1,5 ccm als 10-Minuten-Menge), bereits hier war Zucker — allerdings in Spuren — nachweisbar. Mit der größeren Harnmenge wurde auch die Zuckerausscheidung größer und hielt bis zum Ende des Versuchs an. Der Zuckernachweis geschah mit der *Trommer*schen Probe, nachdem durch Kochen des Harnes mit verdünnter Schwefelsäure die Maltose bzw. Galaktose in Glucose gespalten war.

II. Erörterung der Ergebnisse.

Der leitende Gedanke der Versuche mit intraperitonealer Infusion hypertonischer Kochsalzlösung war folgender: In den Versuchen von *Curtis* erschien die durch Euphyllin ausgelöste Diurese von der Zunahme der Blutchloride bedingt. Die Frage war berechtigt, ob andere Arten der Erhöhung des Chloridgehalts des Blutes gleichfalls diuretisch wirksam sein würden. Daher wurde versucht, ohne Verdünnung des Blutes, wie es bei intravenöser Injektion der Fall ist, die Blutchloride zu erhöhen. Das gelang wohl, aber gleichzeitig mußte man erfahren, daß trotzdem keine Diurese zustande kam. Schon diese ersten negativen Ergebnisse zeigten, daß der Chloridanstieg im Blute allein für sich eine gesteigerte Diurese nicht erzwingen kann. Daher müssen auch bei den Euphyllinversuchen von *Curtis* ohne Frage für die Diurese noch andere Faktoren wirksam sein. Er hat auf das mobilisierbare Wasser hingewiesen. In meinen Versuchen, deren methodische Anordnung mit Absicht von derjenigen *Curtis'* abweicht, tritt die Bedeutung der Richtung, in welcher mobilisierbares Wasser wandert, deutlich als weitere Bedingung hinzu.

Da die infundierte Flüssigkeit stets am Ende des Versuchs isotonisch gefunden wurde, mußte ein Wassereinstrom aus dem Blute in die Peritonealhöhle angenommen werden, und es lag die Vermutung nahe, daß dieser Wasserentzug das Zustandekommen der Diurese hindern konnte. Daher wurde gleichzeitig mit der intraperitonealen Infusion von hypertonischer Kochsalzlösung Wasser per Klysma gegeben, aber auch diese Wasserzufuhr bedingte keine Diurese und andererseits wurde die Euphyllinwirkung durch eine gleichzeitige intraperitoneale Infusion von hypertonischer Kochsalzlösung nicht im geringsten im Sinne einer Verringerung der Diurese beeinflußt (Kurve 3). Dieser letzte Versuch braucht allerdings nicht unbedingt gegen die Bedeutung

der Wasserablenkung bei meinen anderen Versuchen zu sprechen. Da die Euphyllinwirkung auf die Gewebe eine so starke sein kann, daß mit dem Chlor auch große Mengen Wasser entzogen werden können, so wäre es denkbar, daß die hierdurch frei gewordenen Wassermengen den durch die isotonische Infusionslösung bedingten Wasserverlust ausgleichen. Würde diese Annahme zutreffen, so müßte man auch weiter folgern, daß in den *Curtis*schen Versuchen auch die Chloridablenkung überwunden worden wäre, da Euphyllin mit dem Wasser auch Kochsalz dem Gewebe entzieht. Da Kurve 3 eine überaus große Diurese zeigt, so kann man sagen, daß der Faktor der Wasserablenkung jedenfalls für die Euphyllindiurese ohne Bedeutung ist, daher kann ihm für die Diurese auch nicht dieselbe Rolle wie der Chloridablenkung zuerkannt werden.

Wenn in der Arbeit der Ausdruck „Blutchloride“ (bestimmt aus dem NaCl-Gehalt) gebraucht wurde, so geschah das in Anlehnung an *Curtis*, welcher über den Sinn dieses Ausdrucks in seiner Arbeit schon Andeutungen gemacht hat. An dieser Stelle soll diese Bezeichnung näher präzisiert werden. Als man den Einfluß des Kochsalzes auf die Wasserbindung in den Geweben kennenlernte, schrieb man die Hauptbedeutung dem Chlorion zu. Als aber *Blum* den Zusammenhang zwischen Ödem und Natr. bicarb. bei Diabetikern nachwies und *L. F. Meyer* zeigte, daß bei Wasserretentionen ernährungsgestörter Säuglinge nicht das Chlor das wirksame sein konnte, weil es nur in Verbindung mit Natrium, nicht aber als Kalium- und Calciumsalz gewichtssteigernd wirkte, sah man das Natriumion als das eigentlich ursächliche für die Wasserbildung an, während man das Chlor unabhängig vom Natrium auch bei der Ödembildung als nicht notwendig betrachtete. Ich kann hier auf diese in der Literatur vielfach erörterte Frage nicht näher eingehen, möchte nur darauf hinweisen, daß ich auf Grund meiner Versuche nicht wagen würde, mit Bestimmtheit das Chlorion als das ursächliche anzusehen, daß vielmehr das Natriumion dafür ebenso in Betracht kommen könnte. In diesem Sinne möchte ich auch die von mir wiederholt gebrauchte Bezeichnung „Blutchloride“ aufgefaßt wissen.

Zum weiteren Studium des Blutkochsalzes in seiner Bedeutung für die Diurese wurden Versuche mit intraperitonealen Zuckerinfusionen angestellt. Sie ergaben, daß die Fälle mit Kochsalzzusatz zur Infusionslösung durchweg eine größere Diurese aufwiesen; bei ihnen war durchgängig der Blutkochsalzspiegel nach der Infusion hoch, während es bei den Fällen ohne Kochsalzzusatz zur Infusionslösung zu einem Sinken des Blutkochsalzspiegels und nur zu geringer Diuresesteigerung kam. Hiernach ist man genötigt, bei diesen Versuchen einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Höhe des Blutkochsalzspiegels und Größe der Diurese anzunehmen.

In dem NaCl-Anstieg im Blute nach Infusionen von Zuckerlösungen mit Kochsalzzusatz kann man eine Parallele zu den *Curtis*schen Befunden bei Euphyllininjektionen erblicken und man sieht, daß dieser der Diurese vorangehende Blutkochsalzanstieg keineswegs eine Eigentümlichkeit der Euphyllindiurese ist.

Zusammenfassung.

1. Durch intraperitoneale Infusion einer hypertonischen Kochsalzlösung gelingt es, den Blutkochsalzspiegel zu erhöhen, aber nicht Diurese herbeizuführen.

2. Die infundierte hypertonische Lösung wird durch Wassereinstrom aus dem Blute isotonisch gemacht, wird resorbiert und bedingt dann eine mäßige Diurese.

3. Auch durch gleichzeitig mit der hypertonischen Infusionslösung per Klysma appliziertes Wasser läßt sich keine Diurese erzeugen, obwohl der Blutkochsalzwert steigt.

4. Intraperitoneale Infusion von hypertonischer Kochsalzlösung und gleichzeitige Euphyllininjektion bedingen eine sehr starke Diurese, der Blutkochsalzspiegel ist dabei hoch. Der durch Ausstrom in die Peritonealflüssigkeit entstehende Wasserentzug spielt entweder hierbei keine Rolle oder wird durch Wassereinstrom aus dem Gewebe überwunden.

5. Intraperitoneale Zuckerlösungen bedingen Diurese; diese ist wesentlich größer, wenn die Infusionslösung etwas Kochsalzzusatz enthält. Bei den Fällen mit größerer Diurese war stets der Kochsalzspiegel nach der Infusion ein hoher.

6. Die Erhöhung des Blutkochsalzspiegels und die darauf erfolgende Diurese läßt sich auch unter anderen methodischen Bedingungen als denjenigen der Euphyllindiurese beobachten.

Literatur.

1) *Blum*, Verh. d. 26. Kongr. f. inn. Med. 1909, S. 122. — 2) *Curtis*, Klin. Wochenschr. 4. Jahrg., Nr. 17. — 3) *Derselbe*, diese Zeitschr. 188, 109, 1925. — 4) *Hamburger*, Proc. Acad. Amsterdam 1922. — 5) *L. F. Meyer*, Verh. d. Ges. f. Kinderheilk., S. 14. Salzburg 1909.

Untersuchungen über den Einfluß von Liquor cerebrospinalis auf die Elektrolytflockung von positiven und negativen Solen bei definierter Wasserstoffionenkonzentration.

Zugleich ein Beitrag zur Frage der Differenzierung von globulin- und albuminreichem Liquor.

Von

Herbert Rosenfeld.

(Aus der I. dermatologischen und der chemischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 4. November 1925.)

Die Kolloidreaktionen des Liquor cerebrospinalis beruhen im wesentlichen auf dem verschiedenen Gehalt des Liquors an Globulinen und Albuminen und der dadurch bedingten Differenz in der elektrischen Ladung des Liquoreiweißes. Da bei einer Wasserstoffionenkonzentration $p_H = 5$ die Globuline positiv, die Albumine negativ geladen sind, wurde der Einfluß normalen und pathologischen Liquors bei $p_H = 5$ auf elektronegative und positive Kolloide untersucht. Es wurde bei den Versuchen von der Annahme ausgegangen, daß bei dieser Wasserstoffionenkonzentration globulinreicher Liquor z. B. (Paralyse) ein positives Sol gegen Elektrolyte schützen, ein negatives sensibilisieren, und daß umgekehrt albuminhaltiger Liquor (Meningitis) ein positiv geladenes Sol gegen Elektrolyte sensibilisieren, dagegen ein negatives schützen würde.

Bevor Versuche mit Liquor selber in Angriff genommen wurden, galt es, zunächst einmal festzustellen, wie positive und negative Sole allein sich bei $p_H = 5$ verhalten. Es war von vornherein anzunehmen, daß sich nicht alle Sole für unsere Zwecke eignen würden. Von negativ geladenen Solen wurden Kongorot, Kongorubin und Mastix, von positiven kolloidales Eisenhydroxyd und Nachtblau untersucht. Die p_H-Messungen wurden kolorimetrisch mit Indikatoren (*Michaelis*) unter Zuhilfenahme des *Walpole*schen Prinzips durchgeführt. Nach Abschluß zahlreicher Vorversuche wurden über 120 normale und pathologische Liquores untersucht. Über die klinische und physikalisch-chemische Bedeutung der Resultate wird in Gemeinschaft mit

Ernst Bloch, von dem auch die theoretischen Überlegungen zu dieser Arbeit ausgingen, in der Deutschen medizinischen Wochenschrift berichtet werden[1]).

I. Flockungsversuche an negativ geladenen Solen.

1. Kongorot und Kongorubin.

Als elektronegativ geladene Sole wurden zuerst Kongorot und Kongorubin untersucht. Kongorot wurde in ähnlicher Fragestellung zuerst von *Brossa* untersucht; *Brossa* wies eine Sensibilisierung des Kongorots gegen Elektrolyte durch Globuline nach[2]). Es wurden wässerige 1proz. Lösungen von Kongorot *Kahlbaum* und Kongorubin *Grübler* hergestellt und auf ihre Verträglichkeit mit Puffergemischen $p_H = 5$ (n/10 Puffer) geprüft. Zusatz von Acetat-, Phosphat- und Tartrat-Puffer bewirkten sofortigen Umschlag der Farbsole in allen Konzentrationen. Beide Farbsole in Alkohol angerührt (0,2 g Farbstoff, 2 ccm absoluten Alkohols, Aqua. dest. ad 200) geben bei Zusatz von Phosphatpuffer keinen Umschlag, wohl aber bei Zusatz von Acetatpuffer. Die Farbsolpuffergemische zeigen aber infolge der geringen Pufferung des Phosphatpuffers bei $p_H = 5$ eine große Nachgiebigkeit und Verschiebung. Eine Fixierung auf $p_H = 5$ war nicht möglich. Weitere Versuche mit Kongorot und Kongorubin wurden daher nicht ausgeführt.

2. Mastix.

Günstigere Verhältnisse finden sich bei Mastix. Die Mastixversuchslösung wurde aus einer 10proz. alkoholischen Stammlösung hergestellt. 1 ccm der Stammlösung wird ½ Stunde vor dem Versuch mit 9 ccm absoluten Alkohols in der Pipette aufgezogen und zu 40 ccm Aqua dest. zugesetzt. Als Aqua dest. wurde in allen Versuchen der Arbeit nur frisch destilliertes Wasser verwendet. Als Pufferlösung wurde ein Acetatgemisch benutzt, das durch Mischung von 400 ccm n/10 Na-Acetatlösung 100 ccm n/10 Essigsäure und 500 ccm Aqua dest. hergestellt wurde. Dieses Puffergemisch hielt seine p_H durch mehrere Wochen inne. Zusatz von diesem Puffergemisch zu der Mastixlösung im Verhältnis 1 : 1 ergibt keine Fällung. Das Mastixpuffergemisch nimmt $p_H = 5$ an und hält sich mehrere Tage. Nun wurden *die Flockungsschwellenwerte des Mastixpuffergemisches* für m/2 Na_2SO_4 und für m/2 $CaCl_2$ *ohne Liquorzusatz in Reihenversuchen* festgelegt. Die Versuchsanordnung war folgende: Zu einem Gemisch von 1 ccm Puffer und 1 ccm Matix wird nach einigen Minuten der betreffende Elektrolyt zugesetzt und mit Aqua dest. auf ein konstantes Gesamtvolumen auf-

---

[1]) *Bloch* und *Rosenfeld*, Dtsch. med. Wochenschr. 1926.

[2]) *Brossa*, Zeitschr. f. Immunitätsf. 37, 211, 1923.

gefüllt. Für m/2 Na_2SO_4 ergab sich als Schwellenwert der Flockung 0,05 ccm, für m/2 $CaCl_2$ 0,005 ccm (abgelesen nach 2 Stunden).

$CaCl_2$ flockt also zehnmal so stark wie Na_2SO_4. Bei gealterter Mastixstammlösung sind die Grenzwerte etwas niedriger.

Nun wurden die *Flockungsschwellenwerte bei Liquorzusatz festgelegt.* Zusatz von unverdünntem Liquor flockt die Mastixlösung aus; als passende Zusatzmenge, ohne Ausflockung zu bewirken, ergab sich 0,02 ccm Liquor = 0,2 ccm einer Verdünnung 1 : 10. Die Flockungsgrenzen sind für Na_2SO_4 0,03, für $CaCl_2$ 0,005 ccm (Tabelle I). Die Flockung in den Röhrchen ist mit Sternchen, der Grad der Flockung durch die Zahl der Sterne bezeichnet.

Tabelle I.

a) p_H = 5,0.

	1	2	3	4	5	6
$^1/_{10}$ Liq. . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
n/10 Na_2SO_4	0,5	0,3	0,2	0,1	—	0,5
Aq.	—	0,2	0,3	0,4	0,5	0,2
P. + M. . .	2	2	2	2	2	2
3 Stdn. . .	*	(*)	—	—	—	—

b) p_H = 5,0.

	1	2	3	4	5	6
$^1/_{10}$ Liq. . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
n/100 $CaCl_2$	0,5	0,3	0,2	0,1	—	0,5
Aq.	—	0,2	0,3	0,4	0,5	0,2
P. + M. . .	2	2	2	2	2	2
3 Stdn. . .	*	—	—	—	—	—

Abkürzungen: Liq. = Liquor, Aq. = Aqua, P. + M. = Puffermastixgemisch 1 : 1.

Normaler Liquor ändert die Flockungsschwellenwerte gegen Elektrolyte nicht.

Bei vermehrtem Eiweißgehalt im Liquor tritt eine starke Sensibilisierung des Mastixpuffergemisches gegen die geprüften Elektrolyte ausnahmslos ein. Tabelle II stellt die Sensibilisierung bei einfacher Globulinvermehrung, Tabelle III bei Lues cerebri, Tabelle IV bei progressiver Paralyse, Tabelle V bei Meningitis dar.

Tabelle II.

Versuch 66. Encephalomalacie. Pandy ***, Wa. R. —, Nonne *, Sublimat *, Siliquid *, Goldsol 1 000 000 Zellen 20/3. p_H = 5.

a)

	1	2	3	4	5	6
$^1/_{10}$ Liq. . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
n/10 Na_2SO_4	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	—
Aq.	—	0,2	0,3	0,4	0,45	0,5
P. + M. . .	2	2	2	2	2	2
1 Std. . .	**	*	*	0	0	0
20 Stdn. . .	****	***	**	*	*	*

b)

	1	2	3	4	5	6
$^1/_{10}$ Liq. . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
n/100 $CaCl_2$	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	—
Aq.	—	0,2	0,3	0,4	0,45	0,5
P. + M. . .	2	2	2	2	2	2
1 Std. . .	***	***	**	*	0	0
20 Stdn. . .	***	***	***	***	**	*

Tabelle III.

Versuch 53. Lues cerebri. Pandy ***, Nonne **, Wa. R. ****, Goldsol 23 321 000 Zellen 48/3. $p_H = 5$.

a)	1	2	3	4	5	6	b)	1	2	3	4	5	6
$^1/_{10}$ Liq. . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	$^1/_{10}$ Liq. .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
$n/10\,Na_2SO_4$	0,5	0,2	0,1	0,05	—	0,5	$n/100\,CaCl_2$	0,5	0,2	0,1	0,05	—	0,5
Aq.	—	0,3	0,4	0,45	0,5	0,2	Aq. . .	—	0,3	0,4	0,45	0,5	—
P. + M. . .	2	2	2	2	2	2	P. + M. .	2	2	2	2	2	2
15 Min. . .	***	***	**	**	0	0	15 Min. .	***	***	***	***	(*)	—
20 Stdn. . .	****	****	****	***	***	0	20 Stdn.	****	****	****	****	***	—

Tabelle IV.

Versuch 56. Progr. Paralyse. Pandy ***, Nonne **, Sublimat ***, Siliquid ***, Goldsol 55 554 321 000 Zellen 40/3. $p_H = 5$.

a)	1	2	3	4	5	6	b)	1	2	3	4	5	6
$^1/_{10}$ Liq. . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	$^1/_{10}$ Liq. .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
$n/10\,Na_2SO_4$	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	—	$n/100\,CaCl_2$	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	—
Aq.	—	0,2	0,3	0,4	0,45	0,5	Aq. . .	—	0,2	0,3	0,4	0,45	0,5
P. + M. . .	2	2	2	2	2	2	P. + M. .	2	2	2	2	2	2
15 Min. . .	***	***	***	***	**	*	15 Min. .	****	****	****	****	*	0

Tabelle V.

Versuch 60. Tb.-Meningitis. Pandy ***, Nonne ***, Goldsol 001 233 321 000 Zellen 60/3.

a)	1	2	3	4	5	5	b)	1	2	3	4	5	6
$^1/_{10}$ Liq. . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	$^1/_{10}$ Liq. . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
$n/10\,Na_2SO_4$	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	—	$n/100\,CaCl_2$	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	—
Aq.	—	0,2	0,3	0,4	0,45	0,5	Aq.	—	0,2	0,3	0,4	0,45	0,5
P. + M. . .	2	2	2	2	2	2	P. + M. . .	2	2	2	2	2	2
15 Min. . .	****	****	****	***	***	*	15 Min. . .	****	****	**	*	*	*

Bei den Globulinvermehrungen (Lues, Paralyse) sind keine prinzipiellen Unterschiede bei der Sensibilisierung des Mastixpuffergemischs vorhanden. Der Eiweißgehalt kann bei allen diesen Fällen so groß sein, daß das Gemisch nach Liquorzusatz auch ohne Salz ausfällt. Bei sofortiger Ablesung sind die Unterschiede (stärkere Sensibilisierung bei Salzzusatz) doch meist deutlich. Die Elektrolytmenge wurde stets nachträglich zugesetzt.

Bei Globulinvermehrung flockt $CaCl_2$, bei Albuminvermehrung (Meningitis, bluthaltiger Liquor) flockt Na_2SO_4 stärker. Mastix wird also durch Globuline und Albumine sensibilisiert.

Die Flockung und Sensibilisierung durch beide Eiweißarten ist bei $p_H = 5$ stark ausgeprägt, weil anzunehmen ist, daß die hier positive Ladung der Globuline potenzierend auf die Ca-Ionen, die hier negativ geladenen Albumine potenzierend auf die SO_4-Ionen wirken.

Endlich wurde die p_H des Mastixpuffergemischs variiert[1]). Die Versuchsergebnisse sind aus Tabelle VI ersichtlich. Erhöhung der Alkalität vermindert, Vermehrung der Acidität erhöht die Flockung. Die Flockung ist auch nach unseren Versuchen als eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration anzusehen.

Tabelle VI.

a) $p_H = 5,0$

	1	2	3	4
$^1/_{10}$ Liq. . . .	0,2	0,2	0,2	0,2
n/10 Na_2SO_4 .	0,3	0,1	0,05	—
Aq	0,2	0,4	0,45	0,5
P. + M. . . .	2	2	2	2
1 Std.	***	**	*	0

b) $p_H = 5,4$

	1	2	3	4
$^1/_{10}$ Liq. . . .	0,2	0,2	0,2	0,2
n/10 Na_2SO_4 .	0,3	0,1	0,05	—
Aq.	0,2	0,4	0,45	0,5
P. + M. . . .	2	2	2	2
1 Std.	*	0	0	0

c) $p_H = 4,6$

	1	2	3	4
$^1/_{10}$ Liq. . .	0,2	0,2	0,2	0,2
n/10 Na_2SO_4	0,3	0,1	0,05	—
Aq.	0,2	0,4	0,45	0,5
P. + M. . .	2	2	2	2
1 Std. . . .	****	****	****	****

II. Flockungsversuche an elektropositiv geladenen Solen.

1. Eisenhydroxydsol.

Nach *Reitstötter*[2]) sensibilisiert Albumin stärker als Globulin ein Fe_2O_3-Sol gegen Elektrolyte. Für unsere Fragestellung war die Verträglichkeit von Eisensol und Puffer p_H 5 wesentlich. Eisensol wird aber durch Zusatz von Puffergemisch (Acetat, Phosphatpuffer) gefällt; es war daher für unsere Versuche nicht anwendbar. Benutzt wurde Liquor ferri oxydati dialysati (*Merck*), 14 Tage im Dialysierschlauch gegen destilliertes Wasser dialysiert.

---

[1]) *Sahlgreen*, Münch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 17, S. 618.

[2]) *Reitstötter*, Kolloidzeitschr. 28, 20, 1921; *Brossa* und *Freundlich*, Zeitschr. f. physik. Chem. 89, 1915; *Pauli-Flecker*, diese Zeitschr. 41.

2. Nachtblau.

Brauchbar erwies sich für unsere Versuche ein elektropositiver, kolloidaler Farbstoff, Nachtblau (*Grübler*). Nachtblau gehört nach *Freundlich*[1]) zu den lyophilen Emulsionskolloiden.

Als Stammlösung wurde eine 1prom. wässerige Lösung hergestellt, die intensiv violett tintenartig aussieht und ziemlich haltbar ist. Nachtblau ist stark alkalisch. Bei Zusatz unseres Puffers $p_H = 5$ im Verhältnis 1 : 1 zu einer Lösung 1 : 10000 wird p_H auf 6,2 verschoben. Auch konzentrierterer Puffer änderte nichts an der Verschiebung. Erst bei einer Verdünnung 1 : 80000 nimmt der Farbstoff p_H des Puffers 5,0 an. Bei dieser Verdünnung (es resultiert bei einem Arbeiten mit 3 ccm Gesamtvolumen eine Verdünnung für Nachtblau von 1 : 320000) ist die Färbung so schwach, daß eine Ablesung nicht möglich ist. Es mußte daher ein stärker sauer reagierender Puffer zugesetzt werden. Bei einem Zusatz eines Gemisches p_H 4,6 (Zusammensetzung: 90 ccm n/10 Na-Acetat, 110 ccm n/10 Essigsäure, Aqua dest. auf 400) im Verhältnis 1 : 1 zu einer 0,01proz. Nachtblaulösung hält sich das Farbstoffpuffergemisch ziemlich konstant auf $p_H = 5$. Auch Liquor und Salzzusatz ändern fast nichts an der Reaktion, so daß wir praktisch stets bei $p_H = 5{,}0$ bis 5,1 arbeiteten. Während Nachtblau ohne Puffer violett gefärbt ist, ist das Pufferfarbstoffgemisch heller und leuchtend blau gefärbt. Eine Flockung durch den Puffer tritt nicht ein. Das Gemisch wird vor dem Versuch frisch hergestellt: aus der 1prom. Stammlösung wird mit Aqua dest. eine Verdünnung 1 : 10 hergestellt und zu gleichen Teilen Puffer zugesetzt. Die Salzmenge wird stets zuletzt zugefügt, etwa nach 10 Minuten. Die Gläser dürfen keine Säure und Alkalireste enthalten, da Nachtblau gegen beides empfindlich ist. Das Aqua dest. war stets frisch destilliert. Es wurde immer bei einem Gesamtvolumen von 3 ccm gearbeitet, also bei einer Nachtblauverdünnung von 1:30000. Zuerst wurden die *Flockungsschwellenwerte* für Na_2SO_4 und $CaCl_2$ *ohne Liquorzusatz* bestimmt (Tabelle VII). Für n/10 Na_2SO_4 ist der Grenzwert 0,1 ccm, bei n/10 $CaCl_2$ tritt eine unregelmäßige Reihe mit oberer und unterer Nichtausflockungszone ein[2]). Während 0,6 ccm nicht flockt, tritt von 0,5 bis 0,2 ccm Flockung ein, 0,1 ccm flockt nicht mehr. Die Salzfällung ist intensiv und geht stets mit Farbveränderung einher. Die überstehende Lösung ist fast farblos, die Flockung ist nach 16 Stunden noch progressiv.

---

[1]) *Freundlich*, Kapillarchemie; *O. Teague* und *Buston*, Zeitschr. f. physik. Chem. **60**.

[2]) *Neisser* und *Friedemann*, Münch. med. Wochenschr. 1903, S. 11; *Bechhold*, Zeitschr. f. physik. Chem. **48**, 385, 1904; *Freundlich* und *Löning*, Festschrift f. d. Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft 1921.

Tabelle VII.

a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n/10 Na_2SO_4	0,13	0,12	0,11	0,10	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	—
Aq.	0,87	0,88	0,89	0,9	0,91	0,92	0,93	0,94	0,95	1,0
Puffer ($p_H = 4,6$) Nachtblau, 1 : 10000	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
16 Stdn.	***	***	***	*	—	—	—	—	—	—

b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n/10 $CaCl_2$	1,0	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	—
Aq.	—	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,3
P. + N.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
16 Stdn.	—	—	—	—	***	***	***	**	—	—

Nun wurde die Zusatzmenge von normalem Liquor bestimmt, die keine Veränderung des Puffersols gibt, aber andererseits noch brauchbare Ausschläge bei Elektrolytzusatz. Während 0,5 und 0,4 ccm normalen Liquors eine Trübung des Gemisches hervorrufen, gibt 0,1 ccm auch bei Eiweißvermehrung keine sicheren Ausschläge. Es wurde daher als Zusatzmenge stets 0,2 Liquor genommen.

Zur Beurteilung pathologischen Liquors mußten die *Fällungsgrenzen für normalen Liquor* festgelegt werden. Nur die Versuche mit Na_2SO_4 gaben brauchbare Resultate, während $CaCl_2$ durch normalen Liquor stark geschützt wird. Es wurde daher von jetzt ab nur mit Na_2SO_4 als Elektrolyt gearbeitet, und zwar stets in $^1/_{10}$ Normallösung. Die eben noch flockende Zusatzmenge an n/10 Na_2SO_4 beträgt 0,25 ccm, die nicht flockende 0,2 ccm (Mittelwerte), siehe Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

$p_H = 5,0.$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
n Liq.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
n/10 Na_2SO_4	0,5	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	0,02	—	0,5
Aq.	0,3	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,78	0,8	0,5
P. + N.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
24 Std.	**	**	*	*	±	—	—	—	—	—	—	***

Gegenüber der reinen Elektrolytflockung (Tabelle VII) ist der *Schwellenwert mit Liquorzusatz* etwas erhöht. Normaler Liquor hat nur eine geringe, ziemlich konstante Schutzwirkung.

Während die reine Salzflockung sehr intensiv ist, besteht die Liquorsalzflockung zunächst nur in einer Trübung und leicht violetter Verfärbung. Bei Betrachten gegen eine künstliche Lichtquelle erscheinen die getrübten Röhrchen violett, die ungeflockten leuchtend blau. Unter der Lupe oder dem Agglutinoskop betrachtet, schwimmen in den getrübten Röhrchen feinste diffus verteilte Farbstoffpartikelchen, die negativen sind homogen oder zeigen einige grobe Farbklumpen oder Fäden.

Unter den pathologischen Liquores interessierten zunächst vornehmlich die beiden Haupttypen: Paralyse (Globulinvermehrung) und Meningitis (Albuminvermehrung).

1. Paralyse.

Bei der progressiven Paralyse tritt bei Nachtblau — im Gegensatz zum negativen Mastixsol — bei $p_H = 5$ keine Sensibilisierung ein. In der Mehrzahl der Fälle war gegenüber dem normalen Liquor ein verstärkter Schutz zu beobachten (Tabelle IX).

Tabelle IX.

Versuch 121. Progr. Paralyse. P *** S ** Si. ** Z. 30/3. Gs. 555 432 100. Wa. R. Liq. 0,25 **** Wa. R. Blut ****

	1	2	3	4	5	6
Liq.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
n/10 Na_2SO_4	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	—
Aq.	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8
P. + N. . .	2	2	2	2	2	2
24 Stdn. . .	*	*	*	—	—	—

Versuch 122b. Progr. Paralyse. P + N = Puffer-Nachtblaugemisch (1 : 1).

	1	2	3	4	5	6
Liq.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
n/10 Na_2SO_4	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	—
Aq.	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8
P. + N. . .	2	2	2	2	2	2
24 Stdn. . .	*	*	—	—	—	—

Der Mittelwert der beobachteten Fälle beträgt 0,5 bis 0,4 ccm n/10 Na_2SO_4 für das noch eben flockende, 0,3 ccm für das eben nicht flockende Röhrchen gegen 0,25 bis 0,2 ccm bei normalem Liquor. In einzelnen wenigen Fällen trat keine Erhöhung der Schutzwirkung ein.

2. Meningitis.

Bei meningitischem Liquor tritt eine starke Sensibilisierung des Solpuffergemisches bei $p_H = 5$ ein. Die theoretische Voraussetzung, daß ein positiv geladenes Sol durch die bei $p_H = 5$ negativ geladenen Albumine gegen Elektrolyte sensibilisiert werden müßte, wird durch die folgenden Versuche bestätigt.

Tabelle X.

Versuch 125. Tb.-Meningitis. Pandy ***, Nonne ***, Sublimat **, Siliquid ***, Zellen 33/3, Goldsol 0012332100, Tb. *, Wa. R. —. $p_H = 5,0$.

	1	2	3	4	5
Liq.	0,2	0,2	0,2	0,2	—
n/10 Na_2SO_4 .	0,2	0,1	0,05	—	—
Aq.	0,6	0,7	0,75	0,8	1,0
P. + N. . . .	2	2	2	2	2
2 Min. . . .	*	*	*	*	—
20 Stdn. . . .	**	**	**	**	—

Tabelle XI.

Versuch 84. Otogene Streptokokken-Meningitis. $p_H = 5,0$.

	1	2	3	4	5
Liq.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
n/10 Na_2SO_4 .	0,2	0,1	0,05	—	—
Aq.	0,6	0,7	0,75	0,8	0,9
P. + N. . . .	2	2	2	2	2
24 Stdn. . . .	**	**	*	*	—

Tabelle XII.

Versuch 119. Eitrige Cerebrospinal-Meningitis. $p_H = 5,0$.

	1	2	3	4
Liq.	0,2	0,2	0,2	—
n/10 Na_2SO_4 .	0,1	0,05	—	—
Aq.	0,2	0,75	0,8	1,0
P. + N. . . .	2	2	2	2
2 Min.	*	*	*	—

Es wurden untersucht: Acht Fälle von tuberkulöser Meningitis, zwei Fälle von Meningo-Myelitis, je ein Fall von otogener Streptokokken-Meningitis und eitriger Cerebrospinal-Meningitis. Die Sensibilisierung ließ sich in jedem der untersuchten Fälle nachweisen. Die Flockung ist vom Eiweißgehalt abhängig. Bei starkem Eiweißgehalt des Liquors tritt die Trübung fast sofort auf. Sie ist spätestens nach 24 Stunden ablesbar. Von Einfluß ist noch das Alter des Sols. Die Nachtblaureaktion geht mit der Meningitiskurve der Goldsolreaktion parallel. Bei der Mehrzahl der Fälle trat nicht nur eine Sensibilisierung gegen Na_2SO_4, sondern auch eine Flockung ohne Elektrolytzusatz auf, die der bekannten gegenseitigen Ausflockung zweier entgegengesetzt geladener Kolloide entspricht.

Bei anderen Erkrankungen, soweit sie untersucht wurden, wie bei Lues cerebri, Lues spinalis, Tabes, multipler Sklerose, Postencephalitis, Meningismus, Tumor cerebri trat keine Sensibilisierung der Nachtblaulösung gegen Elektrolyte ein. Bei einem Tumor des Kleinhirn-

Brückenwinkels mit begleitender Leptomeningitis und Meningitiszacke im Goldsol trat positive Nachtblaureaktion ein, bei einem Gumma des Gehirns nicht. In einem Falle von Paralyse mit meningitischem Einschlag nach einem apoplektischen Insult (paralytischer Anfall) trat Sensibilisierung, bei luetischer Meningitis keine oder höchstens geringe Sensibilisierung ein.

Aus den hier mitgeteilten Versuchen ergibt sich somit die *Möglichkeit, mit einer einfachen Reaktion den entzündlichen Charakter einer Eiweißvermehrung im Liquor nachzuweisen.* Über die technische Ausführung der Nachtblaureaktion siehe *Bloch-Rosenfeld.*

Interessant sind auch die Ergebnisse bei bluthaltigem Liquor. Normaler, bluthaltiger Liquor sensibilisiert Nachtblau stark durch das Vorhandensein der Serumalbumine parallel mit der Serumzacke des Goldsols. Bluthaltiger Liquor eines Paralytikers gibt indessen gegenüber dem normalen bluthaltigen Liquor einen relativen Schutz (Tabelle XIII). Dieser interessante Befund wird in späteren Versuchen verfolgt werden.

Tabelle XIII.

a) Normaler bluthaltiger Liquor. $p_H = 5,1$.	1	2	3	4	5	b) Paralytischer bluthaltiger Liquor. $p_H = 5,1$.	1	2	3	4	5
Liq.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	Liq.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
n/10 Na_2SO_4	0,3	0,2	0,1	0,05	—	n/10 Na_2SO_4	0,3	0,2	0,1	0,05	—
Aq.	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	Aq.	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8
P. + N. . .	2	2	2	2	2	P. + N. . .	2	2	2	2	2
16 Stdn. . .	*	*	*	*	*	16 Stdn. . .	*	*	—	—	—
24 „ . .	**	**	*	*	*	24 „ . .	*	*	±	—	—

Es wurden noch Versuchsreihen mit Nachtblau in absteigenden Verdünnungen der Liquormenge (in geometrischer Reihe) *ohne Pufferzusatz* angestellt, nach dem Vorbild der Goldsolverdünnungsreihe.

Es ergab sich dieselbe Flockung (in den ersten vier Röhrchen) bei normalem, paralytischem und meningitischem Liquor. Die beschriebenen Unterschiede sind also vom Pufferzusatz abhängig. Die Liquorzusatzmenge im ersten Röhrchen beträgt 0,2 zu 0,8 ccm Aqua dest. (Tabelle XIV).

Tabelle XIV.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Liq. verd. . . .	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
Nachtblau 10/1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24 Stdn. Normal . .	****	***	**	*	0	0	0	0	0	0
24 Stdn. Paralyse . .	****	***	**	*	0	0	0	0	0	0
24 Stdn. Tb.-Meningitis .	****	***	**	*	0	0	0	0	0	0

Endlich wurden Versuche mit variierter Wasserstoffionenkonzentration des Puffers angestellt (Tabelle XV).

Tabelle XV.

			5,9			5,3				5,0			4,7		
			1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3
		Liquor . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
		n/10 Na_2SO_4	0,2	0,1	0,05	0,3	0,2	0,1	0,05	0,2	0,1	0,05	0,2	0,1	0,05
		Aq.	0,6	0,7	0,75	0,5	0,6	0,7	0,75	0,6	0,7	0,75	0,6	0,6	0,75
		P. + N. . .	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
24 Stunden	a	Normal . .	*	$\underline{*}$	—	*	$\underline{*}$	—	—	$\underline{*}$	—	—	—	—	—
	b	Paralyse . .	*	$\underline{*}$	—	$\underline{*}$	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	Lues cerebri	*	$\underline{*}$	—	*	$\underline{*}$	—	—	$\underline{*}$	—	—	—	—	—
	d	Meningitis .	**	**	**	**	**	*	*	*	*	*	—	—	—

Aus Tabelle XV ergibt sich, daß auch die Nachtblauflockung eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration ist. Bei $p_H = 5,9$ sind die Globuline bereits genügend stark negativ geladen, um das positive Sol zu sensibilisieren; bei $p_H = 4,7$ ist die negative Ladung der Albumine so stark herabgesetzt, daß eine Flockung nicht mehr eintritt; bei 5,3 tritt eine leichte allgemeine Erhöhung der Flockungsbereitschaft ein; bei 5,9 können also auch normaler und paralytischer Liquor flocken. Optimal tritt die Nachtblaureaktion eben bei 5,0 bis 5,1 ein.

Zusammenfassung.

1. Kongorot-, Kongorubin- und Eisenhydroxydsol sind für Versuche bei $p_H = 5$ unbrauchbar.

2. Mastix wird bei $p_H = 5$ durch $CaCl_2$ in zehnfach schwächerer Konzentration geflockt als durch Na_2SO_4; normaler Liquor — in der angewandten Zusatzmenge — hat keinen Einfluß auf die Elektrolytwirkung.

3. Mastix wird durch jede Eiweißvermehrung im Liquor sensibilisiert. Meningitischer Liquor sensibilisiert stärker gegen Na_2SO_4, paralytischer und luischer stärker gegen $CaCl_2$.

4. Nachtblau wird durch Na_2SO_4 in schwächerer Konzentration als durch $CaCl_2$ geflockt. Bei der $CaCl_2$-Flockung treten unregelmäßige Reihen auf.

5. Normaler Liquor schützt Nachtblau gegen Na_2SO_4. Diese Schutzwirkung tritt in vermehrtem Maße bei Paralyse auf. Meningi-

tischer Liquor sensibilisiert Nachtblau gegen Na_2SO_4 oder flockt den Farbstoff *auch* ohne Elektrolytzusatz — bei p_H 5 — aus.

6. Nachtblau ohne Pufferzusatz ergibt keine Unterschiede zwischen Paralyse, Meningitis und normalem Liquor.

6a. Die Nachtblauflockung ist, wie die Mastixflockung, eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration.

7. *Die Nachtblauflockung bei $p_H = 5{,}0$ ist somit ein wertvolles Reagens zur Differenzierung albuminreichen Liquors (Meningitis) von vorwiegend globulinhaltigem (Paralyse).*

Über den Chemismus der Eiweißkoagulation.

Von

E. Freund und **B. Lustig.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des Rudolfspitals in Wien III.)

(Eingegangen am 5. November 1925.)

Die Erscheinung der Hitzekoagulation wird als eines der Kriterien der echten oder nativen bzw. der Eiweißkörper im engeren Sinne aufgefaßt und ist eines der wichtigsten Beurteilungsmittel für die Identifizierung der Eiweißstoffe. Seiner chemischen Natur nach ist der Prozeß der Hitzegerinnung völlig ungeklärt und wurde lange für eine rein physikalische Zustandsänderung angesehen.

Frederique[1]) u. a. fanden, daß die Temperatur, bei welcher die Hitzegerinnung eintritt, für die verschiedenen Eiweißkörper verschieden ist, und hielten diesen Punkt, den Koagulationspunkt, für eine physikalische Konstante. Diese Beobachtung benutzte man zur Charakterisierung und Trennung der einzelnen Eiweißkörper durch fraktionierte Hitzekoagulation. An dieser Auffassung änderte die Erfahrung, daß die Reaktion der Lösung und der Gehalt an Salzen die Reaktion beeinflussen, zunächst nichts. Die älteste Publikation über die soeben erwähnte Beobachtung stammt von *Lieberkühn*[2]); eine bestimmte Formulierung erfuhren die Erfahrungen über den Einfluß der Reaktion erst durch *Brücke*, *Neumeister*[3]), *Limbourg*[4]) und andere dahin, daß eine quantitative Fällung nur bei schwach saurer Reaktion erfolge. Der Einfluß des Zusatzes von Neutralsalzen ist laut *Aronstein*[5]), *Heinsius*[6]) u. a. im allgemeinen ein fällungsbefördernder, d. h. es zeigt sich im dialysierten Albumin entweder keine Koagulation oder nur eine geringe Trübung, während Salzzusatz eine Ausfällung zur Folge hat. Allerdings lassen die Untersuchungen anderer Autoren erkennen, daß das Verhalten von Salzen nicht eindeutig ist. Schon *Sebelien*[7]) zeigte,

---

[1]) Zeitschr. f. Physiol. **3**, 601, 1890; *Hewlett*, Journ. of phys. **13**, 493, 1892.

[2]) Arch. f. anat. Phys. u. Med. 1848, S. 285.

[3]) Zeitschr. f. Biol. **24**, 272, 1888.

[4]) Zeitschr. f. phys. Chem. **13**, 450, 1889.

[5]) Pflügers Arch. **8**, 75, 1874.

[6]) Ebendaselbst **9**, 514, 1874.

[7]) Zeitschr. f. Physiol. **9**, 445, 1885.

daß Kochsalz den Koagulationspunkt um 2 bis 14° C erhöhen kann; dieselbe Beobachtung finden wir bei *Spiro*[1]). Dieser Autor weist auch darauf hin, daß Alkohol und Aceton den Koagulationspunkt erniedrigten, die mehrwertigen Alkohole der Fettreihe, die Ester, Ketone dagegen koagulationsverzögernd wirken; sie vermögen den Koagulationspunkt zu erhöhen. Die Einwirkung von Neutralsalzen auf den Koagulationspunkt unterzog *Pauli-Handovsky*[2]) einer eingehenden Untersuchung. Er unterscheidet zwei Phasen der Koagulation:

1. die eben eingetretene Trübung (Opaleszenz),
2. undurchsichtige Fällung.

Die Zeit zwischen den zwei Phasen ist verschieden, je nach der Konzentration der Salze. Bei niederem Salzgehalt ist die erste Trübung bläulich opaleszierend und nur allmählich in die Fällung übergehend. Bei hohem Salzgehalt ist die Phase 1 grau und schnell in 2 übergehend. Die Salze erhöhen den Koagulationspunkt, und zwar bei niederer Konzentration mehr wie bei der höheren. Die Erhöhung des Koagulationspunktes ist verschieden, je nach der Art des Kations und Anions des Salzes, wobei Anion und Kation sich additiv wirksam erweisen. Die Salzhemmung der Hitzekoagulation führt nur zu einem Ausbleiben des sichtbaren Zusammenflockens, nicht aber der Denaturierung. Die Salzionen treten mit dem amphoteren Eiweiß zu Absorptionsverbindungen zusammen, wobei die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Eiweißes markante Änderungen erfahren. Nach *Aron*[3]) beeinflußt auch eine Reihe Farbstoffe den Koagulationspunkt, indem sie Additionsverbindungen geben. Die gleiche Wirkung üben nach *Frey*[4]) die Alkaloide aus. Bezüglich der Einwirkung von Formaldehyd auf Eiweißstoffe fand *Blum*[5]), daß er die Koagulation verhindert. *L. Schwarz*[6]) zeigte, daß auch andere Aldehyde dieses bewirken. Es genügen nach *Memaretti*[7]) 0,35 Proz. Formaldehyd, um die Koagulation bei Serum zu verhindern. Auskoaguliertes Eiweiß wird sowohl durch Pepsin wie Trypsin nach *A. H. Bizarro*[8]) und *Roseo*[9]) leichter verdaut als nicht koaguliertes. *Abderhalden*[10]) bestätigt diese Angaben, dabei fand er, daß die Art der Koagulation und die Teilchengröße Unterschiede bedingen. Es dürften sich also, wie schon *Erb*[11]) ausgesprochen hat, die unter verschiedenen Modalitäten (wie Salzkonzentration, Reaktion) gewonnenen Endprodukte in gewissen Belangen unterscheiden. Die Unterschiede können jedoch das Wesen des Vorganges, das ist Übergang der kolloiden Form in die feste Phase, sowie die Irreversibilität des Vorganges, nicht berühren, da diese beiden Charakteristika allen Hitzekoagulationen gemeinsam sind. So findet auch *Pauli*[12]), daß die Angaben von *Corin-Ausiaux*[13])

[1]) Hofmeisters Beitr. **4**, 300, 1904; Zeitschr. f. phys. Chem. **30**, 182, 1900.
[2]) Hofmeisters Beitr. **11**, 414, 1908.
[3]) Diese Zeitschr. **5**, 414, 1907.
[4]) Arch. f. exper. Path. u. Therap. **95**, 36, 1922.
[5]) Zeitschr. f. phys. Chem. **23**, 127, 1896/97.
[6]) Ebendaselbst **32**, 460, 1900/01.
[7]) Arch. f. Pharm. **14**, 460, 1912.
[8]) Journ. of phys. **46**, 267, 1917.
[9]) Arch. di Fisiol. **10**, 459, 1912.
[10]) Zeitschr. f. phys. Chem. **81**, 1912.
[11]) Zeitschr. f. Biol. **41**, 309, 1908.
[12]) Hofmeisters Beitr. **10**, 53, 1907.
[13]) Bull. del Acad. Roy. de Belg. **21**, 355, 1891.

und von *Wells-Levis*[1]) über die teilweise Reversibilität des Vorganges im Moment der Koagulation nicht zutreffen; es handelt sich wahrscheinlich um die Löslichkeit kleiner Mengen koagulierter Eiweißstoffe durch die vorhandenen alkalischen Salze oder das restierende, noch nicht denaturierte Eiweiß. So finden auch *Chick-Martin*[2]), daß der Koagulationspunkt eines Eiweißkörpers weitgehend von der Art der Erwärmung abhängig ist. Erhitzt man zwei gleiche Teile einer Eiweißlösung verschieden rasch, so koaguliert die langsam erwärmte (vorausgesetzt, daß die Erwärmung langsam genug erfolgte) um einige Grade niedriger als die schneller erwärmte.

Andererseits gibt es eine Reihe von Angaben, die den Vorgang als chemisch erscheinen lassen.

Dahin gehören folgende Tatsachen: Während die Eiweißkoagulation in wässeriger Lösung fast ausschließlich zwischen 50 und 80° C stattfindet, vertragen nach *Wichmann*[3]) reine Eiweißkristalle ohne Veränderungen ein mehrstündiges Erhitzen auf 150° C, ebenso nach *Chick-Martin*[2]) entwässertes Ovalbumin bis 120° C. Bei der Hitzekoagulation ändert sich nach *Quagiarello*[4]) die Konzentration der Wasserstoffionen, und zwar tritt eine Verminderung der $H^{\cdot}$-Konzentration ein. *Sörensen-Jürgens*[5]) erklären, daß beim längeren Erwärmen eines Albumins in neutralen, schwach sauren oder schwach alkalischen Lösungen nach und nach eine Spaltung unter Bildung stickstoffhaltiger Substanzen eintritt. Danach hängt es also weitgehend von der Dauer der Erhitzung ab, ob und in welchem Maße ein Eiweißkörper bei der Hitzekoagulation zersetzt wird. *Osborne*[6]) berichtet, daß Pflanzeneiweiß durch Kochen stark alkalisch wird. Unter den Problemen, die in diesem Zusammenhang auftreten, ist das naheliegendste, ob nicht bei der Hitzekoagulation eine Abnahme oder Aufnahme von Wasser stattfindet. *Starke*[7]) vermutet, daß bei der Hitzekoagulation es sich um eine Wasserabgabe handelt, wobei das Wasser nach der Art des Kristallwassers gebunden war. (Dagegen sprechen die Erfahrungen beim Erhitzen von Eiweißkristallen.) Die Vermutung, daß es sich bei der Hitzekoagulation um eine Hydrolyse handelt, hat *Duclaux*[8]) ausgesprochen. *Chick-Martin*[9]) kommen auf Grund der Erhöhung der Denaturierungsgeschwindigkeit beim Erhitzen auf eine höhere Temperatur, zu dem Schluß, daß wir es bei der Hitzekoagulation mit einer chemischen Änderung zu tun zu haben, und zwar wahrscheinlich mit einer Wasseraufnahme. Denselben Standpunkt vertritt in seinen Arbeiten *Lepeschkin*[10]). Er hat sich zur Aufgabe gemacht, indirekt durch Messung der Abhängigkeitsgeschwindigkeit der Koagulation von Säuren, Basen und Salzen zu entscheiden, ob wir bei der Wasseraufnahme es mit einer Hydrolyse oder

[1]) Journ. of biol. Chem. **49**, 24, 1924.
[2]) Journ. of phys. **40**, 404, 1910.
[3]) Zeitschr. f. Physiol. **27**, 575, 1899.
[4]) Diese Zeitschr. **44**, 157, 1912.
[5]) Ebendaselbst **31**, 397, 1911.
[6]) Ergebn. d. Physiol. **11**, 47, 1910.
[7]) Zeitschr. f. Biol. **13**, 206.
[8]) Ann. d. Inst. Pasteur 7/1, S. 57.
[9]) Journ. of physiol. **45**, 65, 1912/13.
[10]) Kolloidchem. Zeitschr. **31**, 342, 1922; Biochem. Journ. **16**, 678, 1922.

Hydratation zu tun haben. Da die Koagulation nur durch schwache Säuren, nicht aber durch Alkalien beschleunigt wird, schließt er auf eine schwache Hydrolyse. Den experimentellen Nachweis der Wasseraufnahme haben weder *Chick-Martin*[1]), noch *Lepeschkin*[2]) versucht, weil sie annahmen, daß die chemische Analyse keine Resultate liefern kann, da die Wasseraufnahme klein und das Eiweißmolekül groß ist. *Hind-Poganyi*[3]) versuchten, durch direkte chemische Elementaranalyse die Wasseraufnahme festzustellen, doch waren die gefundenen Resultate innerhalb der natürlichen Fehlergrenzen.

Es schien uns von Interesse zu sein, diesem Problem mit einer geänderten Methodik beizukommen. Die Zahl der Methoden, mit welchen wir dieses nachkontrollieren könnten, ist sehr klein, schon aus diesem Grunde, weil es sich um geringe Differenzen im Wassergehalt handelt. Die Methoden, die uns zur Verfügung stehen, sind folgende:

1. Gleiche Mengen von Eiweißstoffen, von denen ein Teil auskoaguliert wird, sind bei niedriger Temperatur (Vakuum) von Wasser zu befreien, und dann ist durch den Gewichtsunterschied oder die Elementaranalyse der Wassergehalt zu vergleichen. Die von *Hind-Poganyi*[3]) mit Hilfe der Elementaranalyse unternommenen Versuche ergaben ein negatives Resultat. Auch unsere in dieser Hinsicht unternommenen Versuche (Gewichtsvermehrung oder Gewichtsverminderung) ergaben Werte, die innerhalb der natürlichen Fehlergrenzen liegen.

2. Die Eiweißlösungen werden mit der gleichen Menge eines nur im Wasser löslichen Farbstoffes behandelt und auf Farbtonunterschiede untersucht. Zu dieser Methode konnten wir uns nicht entschließen, weil die bei der Hitzekoagulation eintretenden Trübungen bei den von uns verwendeten Farbstoffen schon den Farbton in einer Weise verändern, daß z. B. der Zusatz von Talk (als Vergleichstrübung) keine genügende Abhilfe schaffen kann.

3. Da durch direkte Bestimmung es nicht möglich war, die Wasseraufnahme oder -abgabe zu bestimmen, so versuchten wir dieselbe auf folgendem Wege zu erschließen. Ein System von Flüssigkeit und Luft, das durch einen leicht beweglichen Stempel abgeschlossen ist, wird bei konstanter Erwärmung eine bestimmte Kurve der Ausdehnungen zeigen, die in dem Moment, wo eine Wasser*bindung* oder *-abgabe* stattfindet, eine Änderung im normalen Verlauf zeigen wird. Die Änderungen des Volumens während der Erwärmung sind durch folgende Faktoren bedingt:

1. Abgabe und Ausdehnung der in der Flüssigkeit eingeschlossenen Gase.

---

[1]) Journ. of physiol. **45**, 65, 1912/13.

[2]) Kolloidchem. Zeitschr. **31**, 342, 1922; Biochem. Journ. **16**, 678, 1922.

[3]) Diese Zeitschr. **128**, H. 4/6, 1922.

2. Ausdehnung der Luft im eingeschlossenen Raume.
3. Ausdehnung der Flüssigkeit.
4. Ausdehnung des Wasserdampfes.

Von diesen Faktoren ist der erste (Ausdehnung der in der Flüssigkeit vorhandenen Gase) durch vorheriges Erhitzen des Untersuchungsmaterials auf 40° C und nachheriges Evakuieren (bei welcher Temperatur bekanntlich die Blutgasanalysen ausgeführt werden) auszuschalten. Die Ausdehnung der geringen Luftmenge muß (auf Grund des *Gay-Lussac*schen Gesetzes) als regelmäßig angenommen werden. Es resultiert daher als Ursache für eine eventuelle Unregelmäßigkeit in bezug auf die geänderte Volumenausdehnung nur die Ausdehnung des Wasserdampfes und der Flüssigkeit. Es müßte also, im Falle unsere Annahme richtig war, in einem geschlossenen Raume und nach Beseitigung eingeschlossener Gase eine Wasseraufnahme eine Verminderung, eine Wasserabgabe eine Vermehrung des Volumens bedingen.

Die zur Ausführung dieser Messungen verwendete Apparatur erhielt folgende Gestalt: ein 50-ccm-Kölbchen mit Halsschliff und eingeschliffenem Thermometer (mit $^1/_{10}{}^0$ C-Skala) wurde mit der jeweils zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllt (immer mit derselben 50-ccm-Pipette) und im Ölbad, möglichst gleichförmig gegen Luftzug geschützt, mit einem Mikrobrenner erwärmt. Zu diesem Zwecke war die ganze Apparatur in einem doppelwandigen Schrank mit Wärmeregulator, der konstant auf 40° C gehalten wurde, untergebracht. Durch Einführung einer elektrischen Lampe wurde ermöglicht, die Ablesung ohne Öffnen der Schranktür durchzuführen. Es wurde auf eine möglichst gleichmäßige und langsame Erwärmung des Inhalts Bedacht genommen, so daß die Temperatur in 5 Minuten um etwa 1° C stieg.

War unter diesen Bedingungen die gewünschte Temperatur nahezu erreicht, so wurde ein in den Halsschliff passendes, rechtwinklig einsetzbares horizontales Kapillarrohr mit einer 1-mm-Skala aufgesetzt, in dem möglichst nahe dem Anfang der Skala sich ein Quecksilbertropfen befand. Das Aufsetzen des Rohres geschah in dieser Weise, daß anfänglich das obere Rohrende mit dem Finger verschlossen blieb, so daß möglichst wenig Luft zwischen dem Quecksilbertropfen und der Flüssigkeit sich befand, denn sonst wären die Fehler durch Vergrößerung des Luftvolumens vielleicht störend gewesen. Die Kapillarröhre wurde vor jedem Versuch, um irgendwelche Störungen zu vermeiden, mit Chromschwefelsäure und Alkoholäther gewaschen.

Der Quecksilbertropfen mußte sich nun proportional der steigenden Temperatur vorwärts bewegen. Diese Volumenänderung wurde am Kapillarrohr pro Gradeinheit abgelesen und entsprach $\Delta v = Fs$,

wobei F der Querschnitt des Röhrchens und s der Weg des Quecksilbertropfens in Millimetern ist. Nachdem der Querschnitt F immer konstant ist, bezeichneten wir uns mit s die Volumenänderungen. Trat irgend eine Unregelmäßigkeit ein, so mußte dies auf Wasserbindung oder Wasserabgabe bezogen werden. Um etwaige Versuchsfehler auszuschließen, wurden zuerst Versuche mit destilliertem Wasser (Tabelle I) und 0,85proz. NaCl-Lösung (Tabelle II) ausgeführt.

Tabelle I.
Destilliertes Wasser.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
°C	s	s pro 1° C	°C	s	s pro 1° C	°C	s	s pro 1° C
60	3	—	61	0	—	62	3	—
61	41	38	62	39	39	63	42	39
62	81	40	63	79	40	64	81	39
63	120	39	64	118	39	65	121	40
64	159	39	65	157	39	66	161	40
65	199	40	66	196	39	67	200	39
66	238	39	67	236	40	68	240	40
67	278	40	68	275	39	69	279	39
68	318	40	69	316	41	70	320	41

Tabelle II.
0,85proz. NaCl-Lösung.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
°C	s	s pro 1° C	°C	s	s pro 1° C	°C	s	s pro 1° C
52	3	—	55	1	—	55	12	—
53	40	37	56	39	38	56	50	38
54	78	38	57	75	37	57	87	37
55	115	37	58	113	37	58	125	38
56	153	38	59	151	38	59	162	37
57	191	38	60	189	38	60	200	38
58	230	39	61	227	38	61	239	39
59	268	38	62	266	39	62	277	38
60	307	39	63	305	39	63	307	40

Diese Versuche graphisch dargestellt, ergaben geradlinige Kurven. Bevor wir uns der sehr interessanten Erscheinung der Hitzekoagulation der Eiweißstoffe zugewendet haben, schien es uns von Interesse, die Methode noch an einem Medium zu kontrollieren, bei dem eine Wasseraufnahme schon bekannt ist.

Ein solches fand sich in der unter anderen auch von *Samec*[1]) untersuchten Stärke, derer bei 58° C liegender Quellpunkt nahe dem Punkte

[1]) Chem. Centralbl. **1912**, 1384.

liegt, bei dem Eiweißstoffe auskoagulieren. Außerdem zeigt die Stärkequellung laut *Lepeschkin*[1]) mit der Koagulation der Eiweißstoffe gewisse Ähnlichkeiten in physikalischer Hinsicht, wie Heterogenität des Reaktionsmediums, hohe Temperaturkoeffizienten bei der Denaturierung usw. Die Versuche wurden mit einer 6proz. Stärkeaufschwemmung ausgeführt (Tabelle III).

Tabelle III.

6proz. Stärkeaufschwemmung.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
°C	*s*	*s* pro 1° C	°C	*s*	*s* pro 1° C	°C	*s*	*s* pro 1° C
49	95	—	50	20	—	50	30	—
50	130	35	51	45	25	51	120	40
51	140	10*	52	55	10*	52	150	30
52	160	20	53	65	10*	53	160	10*
53	180	20	54	90	25	54	190	30
54	195	15*	55	125	35	55	200	10*
55	210	15*	56	135	10*	56	207	7*
56	235	25	57	165	30	57	210	3*
57	255	30	58	190	25	58	213	3*
—	—	—	59	220	30	59	254	28
—	—	—	—	—	—	60	287	33

Die Veränderungen, die wir bei der Stärke beobachtet haben, beruhen neben der Porenquellung hauptsächlich auf der Lösungsquellung, welche bei 55 bis 57° C auftritt und zur Verkleisterung führt; sie äußert sich in allmählichen Volumenvergrößerungen der Stärkekörner, welche laut *Samec* bei 58° C platzen, erkennbar am Unscharfwerden des Glühlampenbildes. Es zeigten sich auch zwei Vorstufen der Quellung bei 51 und 53° C. Zwei- bis dreimaliges Erhitzen desselben Materials lieferte ähnliche Resultate, nur entsprach der zunehmenden Verkleisterung ein allmähliches Undeutlichwerden der charakteristischen Punkte. Führten wir durch längeres Erhitzen auf 70° C die Verkleisterung vollständig herbei, so erhielten wir nachher Resultate, die sich mit denen des destillierten Wassers deckten.

Zusammenfassend können wir sagen, daß uns die destillierten Wasser- und Stärkeversuche verläßliche Grundlagen bezüglich Beurteilung von Wasseraufnahme oder -abgabe geboten haben.

Es wurden daraufhin zu den folgenden Untersuchungen Serumlösungen herangezogen. Das Material zu den Versuchen wurde bei

[1]) Kolloidchem. Zeitschr. 32, 42, 1922.

40° C etwa eine halbe Stunde evakuiert, um es von CO_2 und anderen Blutgasen zu befreien. Alle Versuche mit Serum- und Eiweißlösungen sind mehrfach wiederholt worden. Die für einen Versuch verwendete Serummenge entsprach einem Stickstoffgehalt von 0,402 g N. Die Versuche mit dem Serum (Tabelle IV) ergaben bei den Temperaturgraden, bei welchen das Eiweiß auskoagulierte, eine Verminderung der durch die gleichmäßige Erwärmung bedingten Volumenvermehrung des über der Flüssigkeit durch Quecksilber abgegrenzten Dampfvolumens, und zwar ergab diese Abnahme, meistens unabhängig von der Zeit, in welcher sie ausgeführt wurde, und von der Art des Erhitzens, entweder einen plötzlichen und scharfen Knick oder eine sich auf mehrere Grade verteilende Verminderung, entsprechend einer starken Koagulation bei einem Grade, oder einer sich auf mehrere Grade verteilenden Auskoagulierung.

Tabelle IV.

Pferdeserum.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
°C	*s*	*s* pro 1° C	°C	*s*	*s* pro 1° C	°C	*s*	*s* pro 1° C
61	0	—	60	2	—	60	4	—
62	34	34	61	40	38	61	44	39
63	59	25*	62	73	33	62	82	38
64	95	36	63	97	24*	63	102	20*
65	123	28*	64	136	39	64	136	34
66	165	42	65	172	36	65	158	22*
67	201	36	66	197	25*	66	198	40
68	242	41	67	236	39	67	235	37
69	279	37	68	276	40	68	275	40
—	—	—	69	316	40	—	—	—

Der Versuch 1 ergab bei 63 und 65° C, der Versuch 2 bei 63 und 66° C, der Versuch 3 bei 63 und 65° C.

Zum Nachweis, ob die beobachtete Knickung tatsächlich sich auf den Koagulationsvorgang bezieht, wurde Serum zuerst auskoaguliert (Tabelle V, Versuch 1) und dann mit diesem auskoagulierten Serum die Prüfung auf Volumenänderungen bei Erwärmung vorgenommen (Tabelle V, Versuch 2 bis 3). Die Wiederholungen ergaben keinerlei Knicke und waren denen vom destillierten Wasser ähnlich.

Wir haben nun die Versuche mit einzelnen Eiweißstoffen fortgesetzt, um nachzusehen, ob auch Substanzen, die verschiedene Koagulationspunkte haben, bei ihrem jeweiligen Koagulationspunkt dieselben Erscheinungen zeigen. Die Eiweißstoffe wurden rein dargestellt, indem sie aus Serum mit Ammonsulfat durch eine Drittel-, Halb- und Ganzsättigung fraktioniert ausgefällt wurden. Die einzelnen Fraktionen wurden wieder mit Wasser aufgenommen und die Fällung wiederholt. Die Eiweißstoffe wurden dann gegen fließendes Wasser

Tabelle V.

Pferdeserum.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
°C	s	s pro 1°C	°C	s	s pro 1°C	°C	s	s pro 1°C
61	1	—	61	12	—	61	18	—
62	40	39	62	50	38	62	55	37
63	67	27*	63	87	37	63	93	38
64	102	35	64	124	37	64	131	38
65	125	23*	65	162	38	65	170	39
66	162	37	66	201	39	66	198	38
67	201	39	67	239	38	67	247	39
68	239	38	68	277	38	68	287	40
69	279	40	69	317	40	—	—	—

14 bis 20 Tage, bis zum Verschwinden der NH_3-Reaktion (mit *Nessler*schem Reagens) dialysiert. Untersucht wurden Globulin (Tabelle VI), Pseudoglobulin (Tabelle VII) und Albumin (Tabelle VIII).

Tabelle VI.

Euglobulin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
°C	s	s pro 1°C	°C	s	s pro 1°C	°C	s	s pro 1°C
59	5	—	61	12	—	60	4	—
60	43	38	62	50	38	61	42	38
61	80	37	63	74	24*	62	80	38
62	117	37	64	110	36	63	112	32
63	143	26*	65	134	24*	64	137	25*
64	179	36	66	172	38	65	173	38
65	213	34	67	211	39	66	196	23*
66	236	23*	68	249	38	67	233	37
67	274	38	69	288	39	68	272	39
68	312	38	—	—	—	69	312	40

Tabelle VII.

Pseudoglobulin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
°C	s	s pro 1°C	°C	s	s pro 1°C	°C	s	s pro 1°C
65	6	—	64	5	—	67	4	—
66	44	32	65	44	39	68	43	39
67	83	39	66	32	38	69	75	32
68	121	38	67	121	39	70	110	35*
69	147	26*	68	157	36	71	147	37
70	186	39	69	179	22*	72	158	21*
71	209	23*	70	216	37	73	208	40
72	249	40	71	242	26*	74	252	44
73	290	41	72	282	40	75	294	42

Tabelle VIII.

Albumin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
°C	s	s pro 1°C	°C	s	s pro 1°C	°C	s	s pro 1°C
62	80	—	63	79	—	64	16	—
63	118	38	64	118	39	65	52	36
64	156	38	65	155	37	66	89	37
65	195	39	66	176	21*	67	114	25*
66	230	35	67	215	39	68	151	37
67	254	24*	68	243	38	69	190	39
68	290	36	70	32	—	70	230	40
69	12	—	71	70	38	71	255	25*
70	51	39	72	100	30*	72	293	38
71	91	40	73	125	25*	—	—	—
72	120	29*	74	166	41	—	—	—
73	159	39	75	200	40	—	—	—
74	200	41	76	257	41	—	—	—

Globulin wurde zwischen 59 und 69° C erhitzt (Tabelle VI). Die dem Eiweißgehalt entsprechende Stickstoffmenge für einen Versuch war 0,256 g N. Die Parallelversuche ergaben gute Resultate bezüglich der Knickpunkte, die den Koagulationspunkten (Tabelle X) entsprachen. Der Versuch 1 ergab Knickpunkte bei 63 und 66° C, der Versuch 2 bei 63 und 65° C, der Versuch 3 bei 64 und 66° C.

Pseudoglobulin (Tabelle VII) wurde zwischen 64 und 75° C erhitzt. Der Stickstoffgehalt für einen Versuch war 0,114 g N. Es zeigten sich bei Versuch 1 Knickpunkte bei 69 und 71° C, bei Versuch 2 bei 69 und 71° C, bei Versuch 3 bei 69 bis 70 und 72° C.

Albumin (Tabelle VIII) wurde zwischen 60 und 76° C erhitzt. Der Eiweißstickstoffgehalt für einen Versuch war 0,0925 g N. Die Versuche ergaben Knickpunkte, und zwar bei Versuch 1 bei 67 und 72° C, bei Versuch 2 bei 66 und 72 bis 73° C, bei Versuch 3 bei 67 und 71° C.

Zur weiteren Kontrolle, ob die beobachteten Änderungen lediglich vom Koagulationspunkt abhängen, haben wir die Versuche in Gegenwart solcher Stoffe ausgeführt, die die Koagulation beeinflussen. Wir untersuchten zuerst den Einfluß der Salze auf die Hitzekoagulation, und zwar die Angaben von *Heinsius*[1]) und seinen Schülern *Aronstein*[2]) und *Kaiseritzky*[3]) über das Verschwinden der Hitzekoagulation, bei dem durch lange Dialyse von Salzen befreiten Eiweiß. Untersucht

[1]) Pflügers Arch. 8, 75, 1874.
[2]) Ebendaselbst 9, 514, 1874.
[3]) Dissertation Dorpat, 1882.

wurden Globulin und Albumin, die 8 und 6 Wochen gegen destilliertes Wasser dialysiert wurden. Nach der Beendigung der Dialyse koagulierte Globulin wie früher, das Albumin aber koagulierte überhaupt nicht beim Erhitzen, zeigte eine schwach alkalische Reaktion und gab bei der Untersuchung der Volumenänderungen beim Erwärmen keinerlei Knickpunkte (Tabelle IX). Nur der Versuch 2 ergab bei 79° C einen schwachen Knickpunkt, wobei aber eine schwache Opaleszenz eintrat. Wir untersuchten dann mit Rücksicht auf die Angaben von *Sebelien*[1]) und *Pauly-Handovsky*[2]), bezüglich der Einwirkung von Salzen auf die Hitzekoagulation, ob nach Zusatz von Salzen der Denaturierungspunkt mit dem Koagulationspunkt vor dem Salzzusatz zusammenfällt (laut Annahme von *Pauly*) oder mit dem nach dem Salzzusatz. Wir verglichen zuerst die Hitzekoagulationspunkte der einzelnen Eiweißstoffe vor und nach dem Salzzusatz (Tabelle X) und dann die Volumenänderungen bei den betreffenden Punkten (Tabelle XI).

Tabelle IX.

Albumin.

Versuch 1			Versuch 2		
°C	*s*	*s* pro 1° C	°C	*s*	*s* pro 1° C
60	20	—	71	32	—
61	52	32	72	67	35
62	86	34	73	105	38
63	122	36	74	150	45
64	155	33	75	200	50
65	188	33	76	0	—
66	223	35	77	42	42
67	261	38	78	96	54
68	297	36	79	126	30*
—	—	—	80	178	52

Tabelle X.

	Salzfrei °C	+ 1 proz. NaCl °C	+ 5 proz. NaCl °C
Globulin, Opaleszenzpunkt	63	65	68,5
„ Koagulationspunkt . . .	66	71	72,4
Pseudoglobulin, Opaleszenzpunkt .	61,5	67	69,5
„ Koagulationspunkt	71	76	78
Albumin, Opaleszenzpunkt	60	69	69,5
„ Koagulationspunkt . . .	77	79	79—80

[1]) Zeitschr. f. Physiol. 9, 445, 1885.
[2]) Hofmeisters Beitr. 11, 414, 1908.

Tabelle XI.

1. Globulin salzfrei			2. Globulin + 1proz. NaCl			3. Pseudoglobulin salzfrei			4. Pseudoglobulin + 1proz. NaCl		
°C	*s*	*s* pro 1°C	°C	*s*	*s* pro 1°C	°C	*s*	*s* pro 1°C	°C	*s*	*s* pro 1°C
61	4	—	62	2	—	64	1	—	66	3	—
62	41	37	63	41	39	65	40	39	67	43	39
63	66	25*	64	79	38	66	72	32	68	82	40
64	102	36	65	113	34	67	107	35	69	119	37
65	126	24*	66	140	27*	68	146	39	70	147	38
66	165	39	67	175	35	69	187	41	71	182	35
67	203	38	68	211	36	70	225	38	72	221	39
68	242	39	69	234	23*	71	253	28*	73	261	40
69	283	41	70	274	42	72	293	41	74	287	26*
—	—	—	—	—	—	—	—	—	75	329	42

Die Versuche ergaben entgegen der bisherigen Annahme, daß der Knick (Denaturierungspunkt) mit dem Koagulationspunkt bei Salzzusatz zusammenfällt.

Wir untersuchten dann die Wirkung von Formaldehyd auf die Eiweißstoffe, da, wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, laut *Blum*[1]), *Schwarz*[2]) und *Memaretti*[3]), Formaldehyd in geringerer Konzentration die Hitzekoagulation verhindert. Untersucht wurde Serum, Globulin und Pseudoglobulin. Die Versuche wurden in dieser Weise ausgeführt, daß je 100 ccm Eiweißlösung mit 4 ccm Formalin versetzt und nach 3 bis 4 Stunden durch Erhitzen auf 40° C und nachherige Evakuierung vom überschüssigen Formaldehyd befreit wurden.

Die Serumlösung koagulierte beim Erhitzen auf 100° C überhaupt nicht, wurde aber schon bei 60° C ganz gelatinös; in Fällen, wo wir diese klare gelatinierte Serumlösung sehr lange (8 Wochen) gegen fließendes Wasser dialysiert haben, war sie stark getrübt und nur schwach gelatinös. Die Prüfung auf Volumenänderung beim Erhitzen konnte wegen dieser Trübung nicht durchgeführt werden. Wir haben es aber mit Erfolg versucht, bei den einzelnen mit Formalin behandelten Eiweißfraktionen die Prüfung durchzuführen. Bei den Untersuchungen der einzelnen Eiweißstoffe zeigte es sich, daß die Reaktion Formalin-Eiweiß zumindest teilweise reversibel ist. Alle Versuche (Tabelle XII) ergaben Knickpunkte bei höheren Temperaturen wie die reinen Eiweißstoffe. Dabei waren die erhaltenen Trübungen geringer, als sie dem Eiweißgehalt entsprachen. Erst wenn die Proben 1 Stunde im Wasserbad gekocht wurden, koagulierte das Eiweiß fast vollständig aus.

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 22, 127, 1896/97.
[2]) Ebendaselbst 31, 460, 1900/01.
[3]) Arch. Farmokol. 14, 460, 1912.

Tabelle XII.

Mit Formalin behandeltes Eiweiß.

Versuch 1. Euglobulin			Versuch 2. Pseudoglobulin			Versuch 3. Euglobulin		
°C	*s*	*s* pro 1°C	°C	*s*	*s* pro 1°C	°C	*s*	*s* pro 1°C
62	12	—	68	7	—	63	7	—
63	50	38	69	47	40	64	45	38
64	89	39	70	86	39	65	83	38
65	129	40	71	126	40	66	122	39
66	167	38	72	149	23*	67	148	26*
67	193	28*	73	183	34	68	190	42
68	233	40	74	210	27*	69	231	41
69	272	39	75	252	42	70	271	40
70	212	40	76	293	41	71	212	41

Wir halten uns nach diesen Versuchen für berechtigt, mit Rücksicht auf die schon früher betonte Einflußlosigkeit der Flüssigkeitsvolumenänderungen gegenüber den Änderungen der Wasserdampftension in den beobachteten Versuchen, eine während des Koagulationsaktes stattfindende Verminderung der Wasserdampftension anzunehmen und sie auf Verminderung des Wassers durch chemische Bindung zu beziehen.

Es handelte sich nun darum, weitere chemische Kriterien der Hitzekoagulation der Eiweißstoffe zu finden. Solche fanden wir bei der Untersuchung der Alkalität und Acidität vor und nach der Hitzekoagulation. Falls wir gleiche Mengen desselben Eiweißstoffes, von dem ein Teil auskoaguliert war, mit n/10 Salzsäure titrierten, zeigten sich beträchtliche Unterschiede zwischen dem auskoagulierten und nicht auskoagulierten Eiweiß (Tabelle XIII). Als Indikator wurde Alizarin verwendet. Die p_H-Konzentration wurde auf Grund der Arbeiten von *Sörensen*[1]) und *Michaelis-Rona*[2]) über die Umschaltspunkte der Indikatoren bestimmt (Tabelle XIV). Untersucht wurden Serum, Globulin, Pseudoglobulin und Albumin mit Rosolsäure, Phenolphthalein, Alizarin, Tropäolin und Kongorot. *Es zeigte sich eine Abnahme der p_H-Konzentration und eine Zunahme der Alkalität beim auskoagulierten Eiweiß.*

Wir haben dann, in Erwägung, ob nicht während der Koagulation ein dialysabler Anteil abgespalten wird, folgende Versuche unternommen:

Zweimal je 50 ccm reiner Pseudoglobulinlösung (0,12 g N), von der ein Teil auskoaguliert war, wurden gegen destilliertes Wasser dialysiert.

---

[1]) Diese Zeitschr. **21**, 201, 1906.

[2]) Zeitschr. f. Elektrotechn. 1908, S. 251; diese Zeitschr. **28**, 61, 1909; *Abderhalden*, Biochem. Arbeitsmethoden **5**, 2. Aufl.

Tabelle XIII.

Alkalinität.

1. Serumlösung (N 0,0482 g).			
Nicht auskoaguliertes Serum	2,70*)	2,75	2,55
Halb auskoaguliertes Serum	3,00	3,10	3,20
Ganz auskoaguliertes Serum	3,35	3,40	3,45
2. Globulin (N 0,0203 g).			
Nicht auskoaguliertes Globulin . . .	0,52	0,56	0,55
Ganz auskoaguliertes Globulin . . .	1,30	1,32	1,28
3. Pseudoglobulin (N 0,0128 g).			
Nicht auskoaguliertes Pseudoglobulin	0,63	0,65	0,66
Auskoaguliertes Pseudoglobulin . .	0,96	0,92	0,97
4. Albumin (N 0,0164 g).			
Nicht auskoaguliertes Albumin . . .	1,38	1,42	1,43
Auskoaguliertes Albumin	1,90	1,86	1,92

*) Diese Zahlen beziehen sich auf Kubikzentimeter n/10 HCl, die für einen Versuch verbraucht wurden; die N-Zahlen auf die Menge des Eiweißstickstoffs für einen Versuch.

Tabelle XIV.

p_H-Konzentration.

Indikator	Nicht koaguliert	Koaguliert
1. Serumlösung.		
Phenolphthalein	—	$1{,}10^{-9}$
Rosolsäure	$1{,}10^{-4}$	$1{,}10^{-8}$
Tropäolin	$1{,}10^{-4}$	$1{,}10^{-5}$
Alizarin	$1{,}10^{-5}$	$1{,}10^{-11}$
Kongorot	$1{,}10^{-5}$—$1{,}10^{-15}$	
2. Globulin.		
Rosolsäure	$1{,}10^{-4}$	$1{,}10^{-8}$
Tropäolin	$1{,}10^{-4}$	$1{,}10^{-5}$
Alizarin	$1{,}10^{-6}$	$1{,}10^{-9}$
Kongorot	$1{,}10^{-5}$—$1{,}10^{-15}$	
3. Pseudoglobulin.		
Rosolsäure	$1{,}10^{-4}$	$1{,}10^{-8}$
Tropäolin	$1{,}10^{-4}$	$1{,}10^{-5}$
Alizarin	$1{,}10^{-6}$	$1{,}10^{-9}$
Kongorot	$1{,}10^{-5}$—$1{,}10^{-15}$	
4. Albumin.		
Rosolsäure	$1{,}10^{-4}$	$1{,}10^{-8}$
Tropäolin	$1{,}10^{-4}$	$1{,}10^{-5}$
Alizarin	$1{,}10^{-6}$	$1{,}10^{-9}$
Kongorot	$1{,}10^{-5}$—$1{,}10^{-15}$	

In Abständen von 3 bis 4 Tagen wurde das Wasser gewechselt und der Stickstoffgehalt bestimmt. Die Versuche ergaben folgende Resultate:

Erste Fraktion (3 Tage dialysiert): Das Wasser wurde mit etwas HCl angesäuert und bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand wurde kjeldahlisiert und der Stickstoffgehalt bestimmt. Das Dialysat der

auskoagulierten Fraktion enthielt 0,4 mg Stickstoff, der nicht auskoagulierten 0,2 mg Stickstoff.

Die zweite Fraktion (3 Tage dialysiert) wurde wie oben behandelt. Das Dialysat des auskoagulierten Pseudoglobulins ergab 0,18 mg Stickstoff, des nicht auskoagulierten 0,1 mg Stickstoff.

Dritte Fraktion 4 Tage dialysiert und wie oben behandelt. Die Dialysate zeigten fast keine Unterschiede im Stickstoffgehalt (0,08 und 0,09 mg Stickstoff). Es zeigte sich bei diesem Versuch, daß bei der Koagulation eine sehr geringe Menge stickstoffhaltiger Substanzen dialysabel gemacht worden ist, doch müssen wir die gefundenen Werte als innerhalb der natürlichen Fehlergrenzen liegend ansehen.

Weiter ergab der Vergleich der Chinon- und Ninhydrinreaktion auf Aminosäuren zwischen koagulierten und nicht koagulierten Eiweißstoffen keinen Unterschied. Bezüglich des Gehaltes an freien Aminosäuren sei auf den weiteren Teil der Arbeit verwiesen.

Eine Reihe weiterer Untersuchungen bezog sich auf die Konstatierung der in Alkohol und Äther löslichen Substanzen und wurde in dieser Weise ausgeführt, daß von zwei gleichen Mengen desselben Eiweißstoffes ein Teil auskoaguliert verwendet wurde. Zur Behandlung gelangten Serum, Globulin, Pseudoglobulin und Albumin. Das Serum (Tabelle XV) wurde, um es von den ätherlöslichen Beimengungen zu befreien, vor der Verwendung so lange mit Äther ausgeschüttelt, bis der Ätherextrakt fast keinen Rückstand zurückließ.

Der Eiweißstickstoffgehalt für einen

Serumversuch	0,5830 g N
Globulinversuch	0,2550 g N
Pseudoglobulinversuch	0,1410 g N
Albuminversuch	0,1255 g N

Von zwei gleichen Mengen jedes Eiweißstoffes wird ein Teil (möglichst feinflockig, durch langsames Erwärmen und Schütteln) auskoaguliert, dann wurden beide Teile mit der vierfachen Menge 96proz. Alkohols gefällt, filtriert und mit Alkohol nachgewaschen. Das Filtrat wurde eingedampft, dann wieder mit Alkohol aufgenommen und bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank bei 80° C getrocknet. Der Rückstand der Alkoholfällung wurde mit Äther ausgeschüttelt, der Äther abfiltriert. Der Ätherextrakt wurde bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand wurde wieder mit Äther aufgenommen und dann bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank getrocknet. Die nach der Ätherextraktion zurückgebliebenen Rückstände der nicht koagulierten Eiweißstoffe lösten sich zum größten Teil wieder im Wasser und koagulierten beim Erhitzen, da die Einwirkungszeit des Alkohols auf die Eiweißstoffe möglichst kurz war.

Tabelle XV.

Alkohol- und Ätherextrakte.

1. Serum.			
Alkoholfraktion des auskoagulierten Serums . .	0,1888	0,1858	0,1866
„ „ nicht auskoagulierten Serums	0,1875	0,1863	0,1869
Ätherfraktion des koagulierten Serums	0,0805	0,0798	0,0801
„ „ nicht koagulierten Serums . .	0,0689	0,0691	0,0686
2. Globulin.			
Alkoholfraktion des koagulierten Globulins . . .	0,0476	0,0472	0,0478
„ „ nicht koagulierten Globulins	0,0482	0,0469	0,0475
Ätherfraktion des koagulierten Globulins	0,0316	0,0321	0,0319
„ „ nicht koagulierten Globulins .	0,0280	0,0275	0,0268
3. Pseudoglobulin.			
Alkoholfraktion des koagulierten Pseudoglobulins	0,0337	0,0361	0,0349
„ des nicht koagulierten „	0,0346	0,0345	0,0351
Ätherfraktion des koagulierten Pseudoglobulins .	0,0151	0,153	0,0153
„ des nicht koagulierten „ .	0,0133	0,141	0,0137
4. Albumin.			
Alkoholfraktion des koagulierten Albumins . . .	0,0468	0,0452	0,0460
„ „ nicht koagulierten Albumins	0,0478	0,0465	0,0472
Ätherfraktion des koagulierten Albumins	0,0137	0,0143	0,0141
„ „ nicht koagulierten Albumins .	0,0082	0,0087	0,0085

Während die Rückstände der Alkoholfraktionen der auskoagulierten und nicht auskoagulierten Eiweißstoffe (Tabelle XV) einander fast gleich waren, zeigten die Ätherrückstände des Serums, Globulins und Albumins (Tabelle XV) ein Plus zugunsten der auskoagulierten Fraktion. Die Ätherrückstände des Pseudoglobulins zeigten ebenfalls diesen Unterschied, doch war er ziemlich gering. Um uns klar zu werden, welche Stoffe die Zunahme der koagulierten Fraktion bedingt, versuchten wir, mit Hilfe eines quantitativen Untersuchungsganges die Zunahme in den einzelnen Fraktionen zu isolieren. Die Ätherfraktionen von Serum wurden (Tabelle XVI) in ein paar Tropfen Äther gelöst, mit Aceton im Überschuß versetzt und filtriert. Der in Aceton unlösliche Teil wurde wieder mit Äther aufgenommen und bis zur Konstanz getrocknet und gewogen. Der in Aceton lösliche Teil wurde nach Verjagung des Acetons am Wasserbad mit heißem, 75proz. Alkohol extrahiert. Der Rückstand wurde mit n/100 Kalilauge titriert und nach der Titration mit alkoholischer Kalilauge verseift und mit Äther extrahiert. Nach der Extraktion wurden die Seifen mit Phosphorsäure im Überschuß versetzt und die frei gewordenen Fettsäuren mit Äther extrahiert. Die Ätherfraktionen von Globulin (Tabelle XVI) und Albumin (Tabelle XVII) wurden ebenso behandelt und gaben, wie die Tabellen (XVI und XVII) zeigen, gleiche Resultate. Die in Aceton

Tabelle XVI.
Serum.

	Koaguliert			Nicht koaguliert		
	Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3
Ätherfraktion	0,0805	0,0798	0,0801	0,0689	0,0691	0,0686
In Aceton unlöslich	0,0072	0,0069	0,0071	0,0074	0,0068	0,0073
„ „ löslich	0,0025	0,0718	0,0726	0,0610	0,0615	0,0612
In heißem Alkohol löslich . . .	0,0346	0,0339	0,0341	0,0329	0,0336	0,0334
„ „ „ unlöslich . .	0,0366	0,0358	0,0368	0,0274	0,0270	0,0272
ccm n/100 KOH	3,6	3,3	3,5	2,7	2,85	2,8
Ätherextrakt nach Verseifung . .	0,0233	0,0229	0,0235	0,0183	0,0180	0,0182
Ätherextrakt nach Ansäuerung .	0,0137	0,0128	0,0134	0,0095	0,0091	0,0093

Tabelle XVII.
Globulin.

	Koaguliert			Nicht koaguliert		
	Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3
Ätherfraktion	0,0316	0,0321	0,0319	0,0278	0,0275	0,0268
In Aceton unlöslich	0,0049	0,0041	0,045	0,0039	0,0043	0,0041
„ „ löslich	0,0266	0,0274	0,0275	0,0237	0,0230	0,0229
ccm n/100 KOH	2,5	2,7	2,6	2,2	2,1	2,1
Ätherextrakt nach Verseifung . .	0,0158	0,0175	0,0175	0,0151	0,0148	0,0146
Ätherextrakt nach Ansäuerung .	0,0096	0,0099	0,0097	0,0078	0,0074	0,0075

Tabelle XVIII.
Albumin.

	Koaguliert			Nicht koaguliert		
	Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3
Ätherextrakt	0,0137	0,0143	0,0141	0,0082	0,0087	0,0085
Aceton, unlöslich	0,0019	0,0016	0,0017	0,0013	0,0014	0,0013
„ löslich	0,0115	0,0127	0,0123	0,0067	0,0071	0,0072
ccm n/100 KOH	1,3	1,2	1,3	0,9	0,8	0,8
Ätherextrakt nach Verseifung . .	0,0076	0,0069	0,0075	0,0041	0,0042	0,0048
Ätherextrakt nach Ansäuerung .	0,0043	0,0046	0,0048	0,0025	0,0028	0,0023

unlöslichen Fraktionen waren schwach stickstoffhaltig, wurden aber, ebensowenig wie die in Alkohol löslichen Serumfraktionen nicht weiter behandelt, wegen der fast gleichen Mengen zwischen den auskoagulierten und nicht auskoagulierten Fraktionen. Die nach der Verseifung in den Äther übergegangenen Teile stellten sich unter dem Mikroskop als Gemenge dar, von dem ein kristallinischer Bestandteil bei 39° C seinen Schmelz-

punkt hatte. Es wurde mit dieser Fraktion eine Reihe Reaktionen vorgenommen, um über die der vorhandenen Stoffe einen Aufschluß zu gewinnen. Von diesen waren *Molischs* Reaktion auf Kohlenhydrate, Biuretreaktion, Millonsreaktion, Tryptophanreaktion (mit formaldehydhaltiger Salzsäure) und Chinonreaktion negativ, die Xanthoproteinreaktion positiv. Weitere Untersuchungen konnten wir, der geringen Substanzmenge wegen, mit diesen Fraktionen nicht ausführen. Die nach der Versetzung mit Phosphorsäure, mit Äther extrahierten Lösungen waren schwach sauer (gegen Lackmus) und bestanden bei Globulin aus einem Gemenge von zwei Stoffen, deren Schmelzpunkte bestimmt wurden. Die Schmelzpunkte der wahrscheinlich aus Fettsäuren bestehenden Stoffe waren bei Globulin bei 34° C und bei 68° C, was der Caprinsäure und Stearinsäure entsprechen würde. Bei Albumin bestand diese Fraktion nur aus einer bei 33° C schmelzenden Substanz, bei Serum aus einem Gemenge, von dem ein in mikroskopischen Nadeln kristallisierender Teil bei 116° C seinen Schmelzpunkt hatte.

Als Gesamtergebnis dieser Untersuchungen ergibt sich, daß die Ätherfraktionen der koagulierten Eiweißstoffe eine Vermehrung gegenüber den nicht koagulierten zeigen. Von dieser ist ein Teil mit alkoholischer n/100 KOH titrierbar, besteht also hauptsächlich aus mit alkoholischer Kalilauge verseifbaren Stoffen. Um aber zu entscheiden, ob die Vermehrung auf Abspaltung von Stoffen aus dem Eiweißmolekül beruht [da Alkohol bei längerer Einwirkung laut *Lepeschkin*[1]) eine ähnliche Denaturierung herbeiführt wie die Hitzekoagulation], wurde folgender Versuch unternommen: Albuminlösung wurde so lange mit Äther ausgeschüttelt, bis der Ätherextrakt fast keinen Rückstand zurückließ. Nach der Extraktion wurden zweimal je 100 ccm der Lösung auskoaguliert und dreimal mit je 100 ccm Äther extrahiert. Dasselbe wurde mit zweimal je 100 ccm nicht koagulierten Albumins ausgeführt als Vergleichslösung. Die Ätherextrakte wurden eingedampft, wieder mit Äther aufgegenommen und zur Konstanz getrocknet (Tabelle XIX). Die Rückstände waren schwach sauer und wurden mit n/100 alkoholischer Kalilauge titriert. Die auskoagulierten Fraktionen verbrauchten 0,45 und 0,5 ccm n/100 alkoholischer Kalilauge, die nicht auskoagulierten je 0,1 ccm n/100 alkoholischer Kalilauge. Durch diese Versuche erscheint erwiesen, daß bei der Hitzekoagulation der Eiweißstoffe eine geringe Menge ätherlöslicher Stoffe wahrscheinlich abgespalten wird.

Um die Zunahme der Alkalität zu erklären, wurden in je 10 cmm Globulinlösung und Pseudoglobulinlösung und in je 5 ccm Albuminlösung, von denen ein Teil auskoaguliert war, die Aminogruppen nach *Sörensen* bestimmt. Der Eiweißstickstoffgehalt für einen Versuch war

[1]) Kolloidchem. Zeitschr. 32, 37, 1923.

Tabelle XIX.

	Versuch 1	Versuch 2
Ätherfraktion des auskoagulierten Albumins .	0,0055	0,0065
„ „ nicht koagulierten „ . .	0,0015	0,0012

bei Globulin 0,0512 g N, bei Pseudoglobulin 0,0282 g N und bei Albumin 0,0164 g N.

Tabelle XX.
Sörensentitrationen, (ccm n/10 KOH).

	Koaguliert	Nicht koaguliert
1. Globulin.		
1. Versuchsreihe . . .	1,80	1,70
2. „ . . .	1,85	1,68
2. Pseudoglobulin.		
1. Versuchsreihe . . .	2,14	1,95
2. „ . . .	2,21	1,98
3. Albumin.		
1. Versuchsreihe . . .	6,16	0,89
2. „ . . .	1,06	0,86

Die Sörensentitrationen ergeben eine Zunahme freier Aminogruppen im auskoagulierten Eiweiß. Man muß also dieses Freiwerden von Aminogruppen als chemischen Effekt der Hitzekoagulation ansehen.

Zusammenfassend können wir sagen, daß wir für unsere Annahme eines chemischen Wesens der Hitzekoagulation eine Reihe analytischer Beweise finden konnten. Wir glauben durch unsere Arbeit folgende chemische Änderungen bei der Hitzekoagulation der Eiweißstoffe nachgewiesen zu haben:

1. Wasseraufnahme,
2. Zunahme der Alkalität,
3. Abnahme der Acidität,
4. Zunahme der freien Aminogruppen,
5. Abspaltung oder leichtere Abspaltbarkeit ätherlöslicher Substanzen, insbesondere Fettsäuren,
6. Zusammenfallen des Denaturierungspunktes bei Salzzusatz mit dem neuen Koagulationspunkt.

Es handelt sich also bei der Hitzekoagulation der Eiweißstoffe um eine Wasseraufnahme, die mit einer Zunahme der Alkalinität und der freien Aminogruppen, Abnahme der p_H-Konzentration verbunden ist. Es erscheint naheliegend, diese Änderung auf eine Aufspaltung einer betainartigen Bindung zu beziehen.

Zur Kenntnis des Chemismus der Seruminaktivierung.

Von

E. Freund und **B. Lustig.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des Rudolfspitals in Wien III.)

(Eingegangen am 5. November 1925.)

Im auffallenden Gegensatze zu dem Reichtum an physiologischen und pathologischen Wirkungen, die die moderne Serologie gelehrt hat, steht die Geringfügigkeit der Kenntnisse, die wir über den chemischen Mechanismus der dabei in Betracht kommenden Reaktionen besitzen. Ist dies einerseits bei der Vielfältigkeit und Kompliziertheit der einzelnen dieser Reaktionen erschwert, so erscheint andererseits ein Einblick in das chemische Geschehen beim Studium der *Verhinderung* der Serumreaktionen erleichtert, denn so mannigfaltig auch die diesbezüglichen Eigenschaften des normalen und pathologischen Serums sein mögen, eine Erhitzung auf 60° C durch wenige Minuten bringt diese ganz zum Verschwinden.

Für die chemische Erklärung dieser Inaktivierung fallen alle tieferen chemischen Eingriffe weg, man kann höchstens an eine Esterspaltung, eine Verseifung, Lactambildung oder -bindung usw. oder an eine Bindung oder Abspaltung der Elemente des Wassers denken.

Von diesen Möglichkeiten erschien uns die Prüfung des letzten als das Nächstliegende.

Als Methode zum Nachweis einer bei der Inaktivierungstemperatur erfolgenden Aufnahme oder Abgabe von Wasser haben wir, da die Eruierung auf dem Wege der Trocknung sowie durch Sättigung mit wasserlöslichen Farbstoffen leicht Fehlerquellen in sich schloß[1]), die Beobachtung der Wasserdampftension während der Erwärmung gewählt.

Wenn man ein Kölbchen mit aufgesetzter horizontaler Kapillare, die mit einem Quecksilbertropfen verschlossen ist, erhitzt, so muß der Quecksilbertropfen um so weiter wandern, je mehr die Flüssigkeit, der Wasserdampf und die eingeschlossenen Gase sich ausdehnen. Da

[1]) Siehe *E. Freund* und *B. Lustig*, diese Zeitschr. **167**, 355, 1925.

die Flüssigkeitsausdehnung gegenüber der Ausdehnung des Wasserdampfes geringfügig und meßbar ist, die in der Flüssigkeit eingeschlossenen Gase durch Erwärmung auf 40° C und darauffolgende Evakuierung entfernt werden konnten, die Luft beim Erwärmen nur eine regelmäßige Zunahme zeigen konnte, so dürften Unregelmäßigkeiten der Ausdehnung bei der Inaktivierungstemperatur nur darauf bezogen werden, daß eine Vermehrung oder Verminderung des Wasserdampfes eingetreten sei bzw. das Wasser vermehrt oder vermindert worden sei.

Es kam also nur darauf an, die regelmäßige und ungestörte Erwärmung unter allen Kautelen auszuführen.

Zu diesem Zwecke wurde in einem geräumigen, mit einer Glaswand versehenen Brutkasten auf einem Ölbad ein 50 ccm fassendes Kölbchen mit seitwärts eingeschliffenem Thermometer mit $^1/_{10}$° C-Skala mit der jeweiligen Untersuchungsflüssigkeit gefüllt und vorsichtig erwärmt. Einige Grade vor Erreichung der Inaktivierungstemperatur wurde ein in den Halsschliff passendes rechtwinklig gebogenes Kapillarrohr, an dessen Anfang sich ein Quecksilbertropfen befand, aufgesetzt und dann der Apparat so langsam erhitzt, daß es etwa 5 Minuten für die Erhöhung der Temperatur um 1° C bedurfte.

Zur Prüfung der Apparatur und zur Vermeidung etwaiger Versuchsfehler wurden destilliertes Wasser (Tabelle I, Versuch 1 bis 2) und 0,85proz. Kochsalzlösung (Tabelle I, Versuch 3) erhitzt, und diese ergaben die in der Tabelle I ersichtlichen Resultate.

Tabelle I.
Die Dampftensionszunahmen des destillierten Wassers und der Kochsalzlösung.

1. destilliert Wasser			2. destilliert Wasser			3. 0,85proz. NaCl-Lösung		
°C	*s**)	*d***)	°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*
50	46	—	50	12	—	61	41	—
51	80	34	51	44	32	62	76	35
52	112	32	52	76	35	63	111	35
53	145	33	53	107	31	64	147	36
54	178	33	54	140	33	65	181	34
55	212	34	55	174	34	66	220	39
56	248	36	56	208	34	67	258	38
57	285	37	57	245	37	68	298	40
58	321	36	58	283	38			

*) *s* ist gleich Weg in mm. — **) *d* ist gleich Weg in mm pro 1° C Einheit.

Um zu sehen, ob die Wasseraufnahme oder -abgabe tatsächlich sich durch Vermehrung oder Verminderung der Wasserdampftension dokumentieren, wurden zunächst Stärkelösungen unter den an-

gegebenen Bedingungen erhitzt, da bei der Stärke laut *Samec* [1]) eine Wasseraufnahme bekannt ist, und ihr bei 58° C liegender Quellpunkt nahe der Inaktivierungstemperatur liegt (Tabelle II).

Tabelle II.
Die Dampftensionszunahmen einer 6proz. Stärkelösung.

1. Versuch			2. Versuch		
°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*
49	60	—	50	20	—
50	95	35	51	45	25
51	130	35	52	55	10
52	140	10*	53	65	10*
53	160	20	54	90	25
54	180	20	55	125	35
55	195	15*	56	135	10*
56	210	15	57	165	30
57	235	25	58	190	25
58	270	35	59	220	30

Nachdem durch diese Versuche erwiesen war, daß Wasseraufnahme oder -abgabe bei unserer Versuchsanordnung sich als Knick der Wasserdampftensionskurve äußert, sind wir an die Untersuchung normaler Sera herangegangen (Tabelle III).

Tabelle III.
Die Dampftensionszunahmen normaler Sera.

1. Versuch			2. Versuch			3. Versuch		
°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*
50	3	46	52	23	—	51	11	—
51	49	46	53	57	34*	52	52	41
52	93	44	54	100	43	53	91	39
53	121	28*	55	122	22*	54	119	28*
54	165	44	56	161	39	55	161	42
55	196	31*	57	201	40	56	201	46
56	241	45	58	243	42	57	244	43
57	284	43	59	286	43			

Wie aus der Tabelle III ersichtlich [2]), zeigen die Sera beim Erhitzen auf 53 und 56° C Verminderungen der regelmäßigen Zunahmen des durch den Quecksilbertropfen abgeschlossenen Dampfvolumens. Dieselben finden bei verschiedenen Seren, nicht genau bei denselben Graden

[1]) *Samec*, Chem. Centralbl. 1912, 1384.

[2]) Eine Reihe gleichlautender Versuche mit destilliertem Wasser, Stärkelösung und normalem Serum wurden im hiesigen Laboratorium von *E. Bruckner* ausgeführt und ergaben gleiche Resultate.

statt, sondern um 1 bis 2° C schwankend, was wohl auf die spezifischen Milieuverhältnisse der einzelnen Sera zurückgeführt werden muß. In allen Fällen ergab aber die Wiederholung der Erhitzung mit schon einmal erhitztem Material (Tabelle IV, Versuch 1) Resultate, die denen des destillierten Wassers gleich waren (Tabelle IV, Versuch 2).

Tabelle IV.

Pferdeserum.

1. Versuch			2. Versuch		
°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*
51	— 21	—	52	8	—
52	23	44	53	43	35
53	57	34*	54	77	34
54	100	43	55	103	36
55	122	22*	56	140	37
56	161	39	57	175	35
57	201	40	58	213	38
58	243	42	59	252	39
59	286	43			

Nach diesen Feststellungen an den normalen Seren sind wir dazu übergegangen, die Beobachtungen an Immunseris auszuführen. Zu diesem Zwecke wurden Diphtheriesera von verschiedener Immunkraft gewählt. In der Tabelle V sind die Resultate mit 50fachen Diphtherieseren verzeichnet.

Tabelle V.

50faches Diphtherieserum.

1. Versuch			2. Versuch		
°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*
51	1	—	52	13	—
52	29	28*	53	38	25*
53	63	34	54	76	38
54	101	38	55	116	40
55	138	37	56	136	20*
56	179	41	57	174	38
57	205	26*	58	216	42
58	248	43	59	257	41
59	289	41	60	300	43

Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigen auch die Immunsera Verminderungen der regelmäßigen Ausdehnungen im Versuch 1 bei 52 und 57° C, im Versuch 2 bei 53 und 56° C. Der Umstand, daß die Verminderungen an zwei Stellen auftreten, ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß die Wasserbindung nicht nur an einer Stelle, sondern an verschiedenen Atomgruppen erfolgt. Es ist darin zunächst kein Unter-

schied zwischen den Verhältnissen des normalen Serums und des Diphtherieserums zu konstatieren. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied zwischen den Normal- und Immunseren darin, daß die Wiederholung der Erhitzung bei schon einmal erhitztem Material (Tabelle VI, Versuch 1) wieder einen, wenn auch schwachen, Knickpunkt bei 55° C ergab.

Tabelle VI.
50faches Diphtherieserum.

1. 50faches Diphtherieserum			2. Wiederholung der Erhitzung		
°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*
52	13	—	51	1	—
53	38	25*	53	38	37
54	76	38	54	77	39
55	116	40	55	115	38
56	136	20*	56	150	35*
57	174	38	57	186	36
58	216	42	58	226	36
59	257	41	59	265	39
60	300	43	60	307	42

Einen weiteren Hinweis dafür, daß der Vorgang mit der Vernichtung des Immunvermögens im Verhältnis steht, ergab die Untersuchung eines hochgradigen (500fachen) Diphtherieserums (Tabelle VII).

Tabelle VII.
500faches Diphtherieserum.

1. Versuch			2. Versuch			3. Versuch			4. Versuch		
°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*	°C	*s*	*d*
52	25	—	50	21	—	50	6	—	51	36	—
53	63	38	51	56	35	51	49	43	52	72	36
54	83	20*	52	100	44	52	87	38	53	110	38
55	126	43	53	126	26*	53	111	24*	54	150	40
56	157	81*	54	129	33	54	147	36	55	191	41
57	197	40	55	186	27*	55	172	25*	56	230	39
48	242	45	56	224	38	56	212	40	57	273	43
59	286	44	57	264	47	57	254	42			
						58	299	45			

Wie die Tabelle VII zeigt, sind die Verminderungen nicht nu stärker als bei den schwächeren Seren, sondern es zeigen sich auc bei der ersten (Tabelle VII, Versuch 2) und zweiten (Tabelle VII Versuch 3) Wiederholung der Erhitzung mit der Substanz von Ta belle VII, Versuch 1, ebenfalls Knicke. Erst die dritte Wiederholun (Tabelle VII, Versuch 4) ergab Resultate, die denen des destillierte Wassers gleich waren.

Wir dürfen daraus schließen, daß bei der Inaktivierungstemperatur, sowohl bei den Normalseren wie bei den Immunseren (bei diesen in erhöhtem Maße), Wasserbindung stattfindet.

Versuche, die unternommen wurden, um mit Hilfe von refraktometrischen Methoden Unterschiede zwischen aktiven und inaktivierten Seren festzustellen, ergaben Resultate innerhalb der Fehlergrenzen.

Es wird Sache der weiteren Untersuchungen sein, nachzusehen, wieweit sich aus diesem Wasserbindungsvermögen, insbesondere bestimmter Fraktionen des Immunserums, eingehendere Erkenntnis über den Chemismus der Aktivität der Sera gewinnen lassen wird.

Über die Wirkung der durchdringenden Radiumstrahlen auf Serum- und Eialbumin.

Von

A. Fernau.

(Aus der Radiumstation des Allgemeinen Krankenhauses in Wien.)

(Eingegangen am 6. November 1925.)

In zwei früheren Mitteilungen[1]) war über die Wirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf durch Dialyse salzfrei hergestelltes Serumalbumin berichtet worden. Bei hinreichend langer Bestrahlung von salzfreiem Serumalbumin tritt Gerinnung ein. Der Ausflockung geht die Denaturierung voraus, denn in der noch klaren, also augenscheinlich unveränderten Albuminlösung ließ sich der durch die Bestrahlung eingeleitete Denaturierungsprozeß an der allmählichen Erniedrigung der Gerinnungstemperatur und leichteren Alkoholfällbarkeit erkennen. So zeigten Proben einer 1,2proz. Albuminlösung, welche sich unbestrahlt bei 55° C trübte und nach einer Bestrahlungsdauer von 3 Tagen 20 Stunden auszuflocken begann,

nach	7stündiger	Bestrahlung	beginnende	Trübung	bei	53° C
,,	24 ,,	,,	,,	,,	,,	49° C
,,	48 ,,	,,	,,	,,	,,	47° C
,,	80 ,,	,,	,,	,,	,,	47° C

Salzgehalt verzögert, Überschreiten eines Salzmaximums verhindert die Ausflockung vollständig. Die Kurve, welche bei der graphischen Darstellung der zur Ausflockung notwendigen Bestrahlungsdauer als Funktion der Albuminkonzentration erhalten wurde, war das Ergebnis der interferierenden Hemmungswirkung der zunehmenden Albuminkonzentration und des abnehmenden Salzgehalts und zeigte an, daß mit zunehmender Albuminkonzentration die zur Ausflockung notwendige Bestrahlungsdauer durch ein Minimum geht, welches 0,5 bis 1 Proz. Albumin entspricht. Unterhalb dieser Konzentration

---

[1]) *Pauli* und *Fernau*, diese Zeitschr. **70**, 426, 1915; Kolloidzeitschr. **30**, 6, 1922.

stieg die Bestrahlungsdauer viel steiler an als oberhalb derselben. Die Erklärung für dieses Verhalten war damit gegeben, daß die Albuminlösung noch geringe Mengen Salz enthielt, welche trotz mehrwöchiger Dialyse nicht vollständig entfernt werden konnten. Die Abnahme der koagulierenden Strahlenwirkung ist bei den niederen Konzentrationen auf den durch die Verdünnung hervorgerufenen verminderten Salzgehalt, bei den höheren Konzentrationen auf den steigenden Salzgehalt zurückzuführen.

Es war demnach von Interesse, die Versuche mit Serumalbumin, welches im *Pauli*schen Elektrodialysierapparat vollständig salz- und globulinfrei gemacht worden war, zu wiederholen und auf Eialbumin auszudehnen.

Pauli und *Adolf*[1]) haben festgestellt, daß durch gewöhnliche Dialyse gereinigtes Albumin noch Globulin enthält, welches infolge vorhandener Salzreste als Salzglobulin in Lösung bleibt. Mit fortschreitender Elektrodialyse werden die geringsten Salzspuren herausgeschafft und zugleich das Globulin bis auf die letzten Reste ausgeflockt und so eine absolut salz- und globulinfreie Albuminlösung fast von der Leitfähigkeit reinen Wassers erhalten.

Wie man aus den folgenden Tabellen ersieht, verhält sich Serum- und Eialbumin gegenüber der Radiumstrahlung verschieden. Während Salz die Ausflockung von Serumalbumin durch die Strahlung verzögert und auch ganz verhindern kann, läßt sich bei Eialbumin keine Schutzwirkung durch Salz nachweisen. Die Gerinnungstemperatur von salzfreiem Serumalbumin konnte durch hinreichend lange Bestrahlung von 49 auf 33° C, die des Eialbumins von 61 nur auf 52° C herabgedrückt werden.

Die Bestrahlung wurde stets an 2,5 ccm Albuminlösung vorgenommen; das 78-mg-Radiumelement in Form von 210 mg Radiumbariumsulfat enthaltende Glasröhrchen von der Wandstärke 1,1 mm war direkt in die Flüssigkeit eingetaucht, in welche es infolge seiner Schwere vollständig versinken konnte. Die zu bestrahlende Albuminlösung befand sich in einem etwa 5 cm hohen, 15 mm weiten Proberöhrchen mit flachem Boden, so daß man einer intensiven Bestrahlung versichert war. Von 1,1-mm-Glas wird noch hinreichend β-Strahlung durchgelassen, welche vorwiegend an der Denaturierung des Eiweißes beteiligt ist. Die Wirkung der γ-Strahlung ist bekanntlich keine primäre, sondern auf die sekundäre β-Strahlung, welche im durchstrahlten Medium erzeugt wird, zurückzuführen[2]). Diese Feststellung gilt

[1]) Bezüglich des Verfahrens vgl. *Pauli* und *Adolf*, diese Zeitschr. **152**, 360, 1924.

[2]) *Pauli* und *Fernau*, Kolloidzeitschr. **20**, 1917.

auch für die Röntgenstrahlung, denn 1 ccm der später beschriebenen 3,48proz. Eialbuminlösung mit einer Dosis von 150 H bestrahlt, war klar geblieben und keine Erniedrigung der Gerinnungstemperatur derselben nachweisbar. Ebenso blieb 2,5proz. Serumalbuminlösung trotz Bestrahlung mit 180 H unverändert.

Pauli und Mitarbeiter[1]) haben in einer Reihe von Arbeiten weitgehende Unterschiede in physikalisch-chemischer Beziehung zwischen Ei- und Serumalbumin, insbesonders ein abweichendes Verhalten von Ei- und Serumalbumin in bezug auf Chlorbindung bei Salzzusatz festgestellt. Meine damit in Einklang stehenden Befunde zeigen, daß die konstitutiven Unterschiede der in den Löslichkeitsverhältnissen ähnlichen Eiweißtypen auch bei der Strahlenwirkung des Radiums deutlich zum Ausdruck kommen.

Versuche mit Serumalbumin. $K = 4 . 10^{-5}$.

Konzentration Proz.	n KCl	Bestrahlungsdauer bis zur beginnenden Flockung
1,27	0	2 Tage 19 Stunden
1,27	0,002	2 „ 19 „
1,27	0,005	5 „ 12 „
1,27	0,01	7 „ — „
1,27	0,10	7 „ — „
2,54	0	3 „ — „
2,54	0,05	8 „ 20 „
2,54	0,10	14 „ (keine Ausflockung)

Fortschreiten der Denaturierung durch Bestrahlung.

Konzentration Proz.	n KCl	Bestrahlungsdauer	Gerinnungstemperatur °C
1,27	0	—	49,2
1,27	0,002	—	49,2
1,27	0,005	—	51
1,27	0,01	—	52
1,27	—	7 Stunden	48,4
1,27	—	19 „	46,2
1,27	—	53 „ (im Flockungsfiltrat)	33
1,27	—	164 „	26
2,54	—	—	49,8
2,54	—	53 „	42

Zunehmende Albuminkonzentration wirkt demnach ähnlich wie Salz als Strahlenschutz, wie aus der verlängerten Bestrahlungsdauer und geringeren Erniedrigung der Gerinnungstemperatur hervorgeht.

[1]) Diese Zeitschr. 1924 u. 1925.

Versuche mit Eialbumin. $K = 6 . 10^{-4}$.

Konzentration Proz.	n KCl	Flockung nach Stunden
1,74	—	8
1,74	0,05	8
1,74	0,1	8
1,74	0,50	8
3,48	0	8

Fortschreiten der Denaturierung.

Konzentration Proz.	Bestrahlungsdauer	Gerinnungstemperatur °C
1,74	—	61
1,74	5 Tage	52
3,48	—	61,2
3,48	2 Tage	52
3,48	4 "	52
3,48	5 "	52

1 ccm 1,74proz. Eialbuminlösung wurde nach 12stündiger Bestrahlung mit 2 ccm Wasser verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde 1 ccm durch 0,25 ccm Alkohol gefällt, während die unbestrahlte Verdünnung 0,8 ccm erforderte.

Über den Wachstumsverlauf von Hefe in Würze.

Von

Oskar Ludwig.

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 12. November 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Wenn man das Wachstum höherer Pflanzen oder einzelner Teile derselben graphisch so darstellt, daß man in einem rechtwinkligen Koordinatensystem auf der Abszisse die Zeit und auf der Ordinate die zu den einzelnen Zeitwerten gehörigen jeweiligen Gesamtwachstumsgrößen (nicht Zuwachsgrößen) abträgt, erhält man eine S-förmig gekrümmte symmetrische Kurve, die sogenannte Wachstumskurve. Sie entspricht annähernd der von *Robertson* aufgestellten Formel: $\log \frac{y}{A - y} = k\,(x - x_1)$, wobei k eine Konstante, y den zur Zeit x erreichten Ertrag, A den Endertrag und x_1 die Zeit bedeutet, bei der die Hälfte von A erreicht ist. In ihrer Grundform geht diese Gleichung aus der Formel einer autokatalytischen monomolekularen Reaktion: $\frac{dy}{dx} = k \,.\, y\,(a - y)$ hervor[1]).

Für Mikroorganismen ist nun ebenfalls schon verschiedentlich der Wachstumsverlauf, natürlich nicht eines Individuums, sondern einer ganzen Kultur, graphisch dargestellt worden, z. B. von *Carlson*[2]) und von *Euler* und *Lindner*[3]), und die Formeln für ihre Kurven sind im Prinzip

[1]) Eine zusammenfassende kritische Darstellung der gegenwärtigen Sachlage und ein vollständiges Literaturverzeichnis gibt *Rippel* in: Wachstumsgesetze bei höheren und niederen Pflanzen (Sammlung Naturwissensch. u. Landwirtsch., 1925, Heft 3).

[2]) *T. Carlson*, diese Zeitschr. 57, 313, 1913.

[3]) *H. Euler* und *P. Lindner*, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung. Leipzig 1915.

dieselben, wie die von *Robertson*. Sie erhielten S-förmige Kurven, deren letzter Teil nach Erreichung einer Höchstzahl an Zellen der Abszisse parallel läuft. Diese Form soll nach *Euler* und *Lindner*[1]) „nicht nur für die Vermehrung von Hefezellen, sondern von einzelligen Wesen überhaupt typisch" sein. Wie aber die folgenden Versuche zeigen werden, treten in Hefekulturen viel kompliziertere Verhältnisse auf, die vorläufig noch unter gar keine Formel zu bringen sind. *Rippel*[2]) macht schon darauf aufmerksam, daß man bei der Zählung von Hefe eine asymmetrische Kurve erhält, die nach rechts jäh abbricht, und führt auch bereits diese Erscheinung auf autolytische Vorgänge zurück. Das jähe Absinken der Kurve bedeutet aber noch nicht das Ende des Wachstums in der Kultur. Es setzt vielmehr bald ein neues Ansteigen der Kurve ein, das sogar über den erst erreichten Höhepunkt hinausführt. Nach einem wiederholten jähen Abbrechen kann sich diese Erscheinung wiederholen. Dieselbe Sachlage fand *Meller*[3]) bei Bacillus vulgaris. Sie gibt eine genaue Darstellung der „Keimzahlkurve", wie sie sich ausdrückt, und verfolgt dabei auch den absteigenden und wiederholt ansteigenden Ast und diskutiert eingehend die Ursachen dieses Verhaltens.

„Über rhythmische Erscheinungen bei Wachstum und Gärung der Hefe" schrieb *E. Köhler*[4]). Doch bedient er sich einer nicht zulässigen Methode, so daß seine Ergebnisse nicht verwertbar sind. Er will das Nacheinander in einer Kultur in ein Nebeneinander auflösen, indem er z. B. 14 oder mehr verschiedene Kulturen anlegt, jede mit einem anderen Zucker- oder Alkoholgehalt. Zu gleicher Zeit bricht er den Versuch ab und ermittelt durch Zentrifugieren die jeweils gebildete Hefemenge. Aus den so erhaltenen Werten zeichnet er dann eine Kurve, die den Verlauf des Wachstums in einer Kultur darstellen soll, ein Verfahren, das natürlich nicht angängig ist, da ja jede Kultur unter anderen, nicht vergleichbaren Wachstumsbedingungen gestanden hat und man nicht 14 oder mehr auf ganz verschiedener Grundlage gewonnene Werte in einer Kurve vereinigen kann, die einen einheitlichen Wachstumsvorgang darstellen soll. *Köhler* rechtfertigt sein Verfahren folgendermaßen[5]): „Da durch die bei der Gärung erfolgende Alkoholproduktion die Alkoholkonzentration dauernd zunimmt, müssen in jeder Kultur nacheinander die Zeitmomente eintreten, wo sie vorübergehend die gleichen Konzentrationen passiert, die die Kulturen mit höherer Anfangskonzentration aufzuweisen haben, und demnach müssen auch in jeder Kultur die gleichen Höhen- und Tiefenpunkte der Gärungsintensität aufeinanderfolgen." Das ist natürlich ein Trugschluß. Unter sonst gleichen Anfangsbedingungen herrschen in einer Kultur, der von vornherein z. B. 1 Proz. Alkohol zugesetzt wurde, ganz andere Verhältnisse, als wenn in einer gleichen Kultur ohne Alkoholzusatz 1 Proz. Alkohol durch Gärung gebildet worden ist, weil inzwischen ja die Nährstoffkonzentration eine ganz andere geworden ist und Stoffwechselprodukte gebildet worden sind. Für gestaffelte Zuckergaben gelten ähnliche Überlegungen. Ab-

[1]) a. a. O., S. 254.
[2]) a. a. O., S. 19.
[3]) *R. Meller*, Centralbl. f. Bakt. II, **64**, 1, 1925.
[4]) *E. Köhler*, diese Zeitschr. **106**, 194, 1920; ebendaselbst **108**, 235, 1920; ebendaselbst **110**, 128, 1920; ebendaselbst **111**, 17, 1920.
[5]) Diese Zeitschr. **108**, 242.

gesehen von der an sich falschen Methode müssen auch die Versuchsfehler sehr groß gewesen sein. Wie aus Abb. 2[1]) hervorgeht, sind sogar zwischen Parallelreihen die Unterschiede so groß, daß keine einwandfreien Ergebnisse zu erwarten sind. Von den beiden am fünften Tage abgebrochenen und in Tabelle I[2]) wiedergegebenen Parallelreihen sind in folgender Zusammenstellung die Mittelwerte mit ihrem wahrscheinlichen Fehler berechnet, ebenso die Differenzen zwischen den einzelnen Kurvenpunkten nebst der ihnen nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz anhaftenden wahrscheinlichen Schwankung. Man sieht auch hier, daß letztere in den meisten Fällen größer als die Differenz selbst ist. Mit solchem Zahlenmaterial kann man wohl nichts beweisen.

Mathematische Auswertung der *Köhler*schen Tabelle I[1]).

Mittelwerte aus zwei Parallelreihen 5. Tag	Differenzen	Mittelwerte aus zwei Parallelreihen 5. Tag	Differenzen
23,2 ± 2,36		24,2 ± 1,18	
	0,2 ± 2,90		2,4 ± 2,95
23,0 ± 1,69		21,8 ± 2,70	
	6,0 ± 1,89		1,1 ± 2,74
29,0 ± 0,84		22,9 ± 0,46	
	0,7 ± 1,05		3,6 ± 2,16
30,3 ± 0,63		26,5 ± 2,11	
	2,3 ± 1,80		3,0 ± 2,11
28,0 ± 1,69		23,5 ± 2,11	
	0,5 ± 1,69		0,3 ± 2,11
27,5 ± 0,04		23,8 ± 0,00	
	1,3 ± 2,24		7,0 ± 0,21
26,2 ± 2,24		16,8 ± 0,21	
	0,6 ± 2,44		1,8 ± 2,54
26,8 ± 0,97		15,0 ± 2,53	
	1,8 ± 0,97		4,4 ± 3,06
25,0 ± 0,00		10,6 ± 1,73	
	0,8 ± 1,18		1,7 ± 1,75
24,2 ± 1,18		12,3 ± 0,25	

Für die Feststellung der jeweiligen Zellenzahl können verschiedene Verfahren in Anwendung kommen[3]). Da, wie schon *Carlson*[4]) erwähnt, die physiologischen Prozesse bei der einsetzenden Gärung „kein ausschließlicher Ausdruck der Zellbildung" sind, scheiden Verfahren wie die Bestimmung des unvergorenen Zuckers, des gebildeten Alkohols oder der entwickelten Kohlensäure von vornherein aus. Auch *Pringsheim*[5]) weist darauf hin, daß zwischen Zellvermehrung und Gärungs-

---

[1]) Diese Zeitschr. **106**, 197.

[2]) Ebendaselbst **106**, 196.

[3]) Über Methodik der Wachstumsmessung siehe *Euler* und *Lindner*, a. a. O., S. 258 ff. *A. Klöcker*, Comptes Rend. des travaux du laborat. Carlsberg XIV, 1919. *Derselbe*, Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe. Stuttgart 1906.

[4]) a. a. O.

[5]) *H. Pringsheim*, diese Zeitschrift **3**, 191ff., 1907.

verlauf kein proportionaler Zusammenhang besteht. Auch für das vielfach übliche Abzentrifugieren mit nachfolgender Trockengewichts- oder Volumenbestimmung konnte ich mich nicht entschließen, da auf diese Weise die Anfangsstadien bei der geringen Aussaat von nur 20 bis 30 Zellen nicht faßbar gewesen wären. Das bei Bakterien übliche Plattenverfahren konnte wegen der Größe der Hefezellen ebenfalls wegfallen, und das bequemere direkte Auszählen unter dem Mikroskop bei mittlerer Vergrößerung mit Hilfe einer Zählkammer dafür in Anwendung kommen. *Euler* und *Palm*[1]) zählten mindestens zwei Proben und jedesmal 60 Quadrate; dann stimmten die Mittelwerte innerhalb 1 bis 5 Proz. Bei unseren Versuchen wurde nach einiger Einarbeitung die gleiche Genauigkeit erreicht; anfangs waren die Fehler vielfach größer (s. Tabelle IV). *Klöcker* zählt je 20 Quadrate in fünf Proben. *Pringsheim* empfiehlt, mit der Zählung neuer Proben so lange fortzufahren, bis das neue Ergebnis den Durchschnitt der früheren Resultate nicht mehr ändert. Ich habe von jeder Probe nach entsprechender Verdünnung $^1/_{10}$ cmm voll ausgezählt. In den folgenden Tabellen sind mit einer Ausnahme der Raumersparnis wegen nur die Mittelwerte aus je drei Zählungen eingesetzt, umgerechnet auf 1 cmm der unverdünnten Nährlösung. Der ebenfalls angegebene wahrscheinliche Fehler[2]) gibt Aufschluß über die Höhe der aufgetretenen Schwankungen. Allgemein werden zwei verschiedene Ergebnisse als gesichert angesehen, wenn sie außerhalb der dreifachen wahrscheinlichen Schwankung liegen. Dieses Verfahren dürfte dem *Pringsheim*schen an Zuverlässigkeit nicht nachstehen.

Euler und *Palm*[3]) verfolgten das Wachstum innerhalb einer Kultur mit 200 oder 500 ccm Nährlösung, indem sie nach bestimmten Zeiträumen nach starkem Umschütteln mit einer Pipette Proben zum Auszählen entnahmen. Dabei ist natürlich die Infektionsgefahr sehr groß, und sie geben selbst an, daß oft mehr als die Hälfte der Versuche aus diesem Grunde unbrauchbar wurde. Außerdem dürfte kaum in der unverdünnten Kulturflüssigkeit durch Umschütteln wegen des auftretenden starken Schäumens ein einigermaßen gleichmäßiges Verteilen möglich sein. Auch ist es ein stark störender Eingriff in das Wachstum der Kultur, wenn etwa alle 4 Stunden durch starkes Schütteln die Sproßverbände auseinandergerissen und auch die Durchlüftungsverhältnisse gewaltsam geändert werden. Bei den folgenden Versuchen

---

[1]) *H. Euler* und *B. Palm*, Zeitschrift f. phys. Chemie 81, 59, 1912.

[2]) Berechnet nach den Angaben in *Th. Pfeiffer*, Der Vegetationsversuch, S. 235. Berlin 1918.

[3]) a. a. O.

wurden daher mit Watte verschlossene Reagenzgläser von 1 cm Durchmesser als Kulturgefäße genommen, und als Nährflüssigkeit je 10 ccm Würze mit einem Maltosegehalt von etwa 9 Proz. 40 bis 50 solcher Röhrchen wurden nach der üblichen Sterilisation in strömendem Dampfe mit je nur etwa 30 Hefezellen geimpft, um bei den späteren Rechnungen die Impfmenge vernachlässigen zu können. Die ganze Serie wurde dann ohne Störung bei konstanter Temperatur gehalten. Zu den aus den Tabellen und Kurven ersichtlichen Zeiten wurden drei wahllos herausgegriffene Röhrchen zusammengegossen, das Ganze im Meßkolben mit Wasser aufgefüllt, je nach der zu erwartenden Zellenzahl, wobei die Kulturröhrchen gründlich ausgespült wurden, und nach gründlichem Umschütteln dreimal $^1/_{10}$ cmm ausgezählt. Die Verdünnung wurde zur Vereinfachung des Zählens so stark eingerichtet (in den letzten Stadien bis zu 4 Liter in einer weithalsigen Glasflasche), daß $^1/_{10}$ cmm von ihr höchstens 100 bis 120 Zellen enthielt. Durch Schlagen mit einem Glasstab und kräftiges Schütteln gelang es, ohne Zusatz von Säuren die Sproßverbände so weit zu zerteilen, daß höchstens zwei oder drei Zellen mitunter noch zusammenhingen. Das Verdünnen der gesamten Kulturflüssigkeit scheint mir genauere Resultate zu liefern als das einer abpipettierten Menge, da eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der unverdünnten Kulturflüssigkeit viel schwerer zu erreichen ist als in einer starken Verdünnung, und daher schon die Probeentnahme eine große Fehlerquelle darstellt, die zu den Schwankungen der Zählproben noch hinzutritt. Das Umschütteln wurde vor der zweiten und dritten Zählung wiederholt. Die Probeentnahme erfolgte unmittelbar darauf, da die Zellen eine erhebliche Sinkgeschwindigkeit besitzen.

Die Entwicklung der einzelnen Kulturen war stets eine ziemlich gleichmäßige. Zum Beweis wurden bei einem Versuch (Tabelle III) die drei bei jeder Zählung verwendeten Röhrchen nicht zusammengegossen, sondern jedes für sich verdünnt und aus jeder Verdünnung drei Proben ausgezählt, so daß die Kurvenpunkte das Mittel aus neun Zählungen von je $^1/_{10}$ cmm darstellen. In Tabelle III sind alle Zählungen wiedergegeben. Die Versuche wurden mit der im Institut fortgezüchteten Hefe *Frohberg* ausgeführt. Die im folgenden mitgeteilten Tabellen und Kurven sind ausgewählte Versuche aus einer größeren Anzahl der gleichen Art. Die absoluten Werte der einzelnen Listen sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da z. B. das Alter des Impfmaterials, Schwankungen im Zuckergehalt der zu verschiedenen Zeiten hergestellten Würze, eventuell Zusätze usw. von Einfluß sind. Doch soll auf diese Fragen hier nicht eingegangen werden, sondern allein die unter den verschiedensten Bedingungen gleichbleibenden Gesetzmäßigkeiten im Kurvenverlauf berücksichtigt werden.

Tabelle I (Kurve a).
Hefe *Frohberg* in Würze (9 Proz. Maltose) + 0,5 Proz. Pepton.
Temperatur: 20° C.
Impfmenge: 30 Zellen.

Zeit Stdn.	Zellenzahl in Tausenden, umgerechnet auf 1 cmm	Differenzen
25	11,2 ± 0,54	10,2 ± 2,61
30	21,4 ± 2,55	39,3 ± 4,08
48	60,7 ± 3,18	10,6 ± 8,07
54	71,3 ± 7,42	50,0 ± 9,36
74	121,3 ± 5,71	1,0 ± 6,60
78	120,3 ± 3,32	34,6 ± 6,53
95	85,7 ± 5,63	18,3 ± 6,12
105	104,0 ± 2,39	29,7 ± 4,87
120	133,3 ± 4,24	8,7 ± 6,69
129	142,0 ± 5,17	19,0 ± 9,83
146	161,0 ± 8,36	25,0 ± 9,63
175	136,0 ± 4,78	19,7 ± 6,86
193	116,3 ± 4,92	6,4 ± 6,49
201	122,7 ± 4,24	59,6 ± 7,21
217	182,3 ± 5,83	36,6 ± 7,63
223	145,7 ± 4,92	2,0 ± 7,94
242	147,7 ± 6,23	

Tabelle II (Kurve b).
Hefe *Frohberg* in Würze (9 Proz. Maltose) + 0,5 Proz. Pepton.
Temperatur: 20° C.
Impfmenge: 30 Zellen.

Zeit Stdn.	Zellenzahl in Tausenden, umgerechnet auf 1 cmm	Differenzen
29	11,4 ± 0,28	30,9 ± 0,54
46	42,3 ± 0,46	14,2 ± 2,87
52	56,5 ± 2,83	36,5 ± 5,89
70	93,0 ± 5,17	31,0 ± 9,23
77	124,0 ± 6,96	4,0 ± 7,19
95	128,0 ± 1,79	1,0 ± 5,66
101	127,0 ± 5,37	20,0 ± 5,96
127	107,0 ± 2,58	13,0 ± 3,65
148	120,0 ± 2,58	13,0 ± 3,94
172	133,0 ± 2,98	12,0 ± 6,79
192	145,0 ± 6,18	16,0 ± 8,88
199	129,0 ± 6,38	7,0 ± 7,73
246	122,0 ± 4,37	

Die Kurven zeigen nicht die von *Lindner* und *Euler* und von *Carlson* wiedergegebene S-Form, es ist auch bei einer weiteren Reihe hier nicht wiedergegebener Versuche nie eine solche erhalten worden. Nach Erreichung eines vorläufigen Höchstwertes klingt die Kurve nicht allmählich in einer Parallelen zur Abszisse aus, sondern es setzt ein ziemlich plötzlicher Abfall ein. Darauf folgt ein neuer steiler Aufstieg, der immer weit über den vorher erreichten Höhepunkt hinausführt. Da diese Erscheinung der mehrgipfligen Kurve immer und unter den verschiedensten Bedingungen auftrat, kann kein Zufall und auch kein Zählfehler vorliegen. Wie die Differenzenspalte der Tabellen

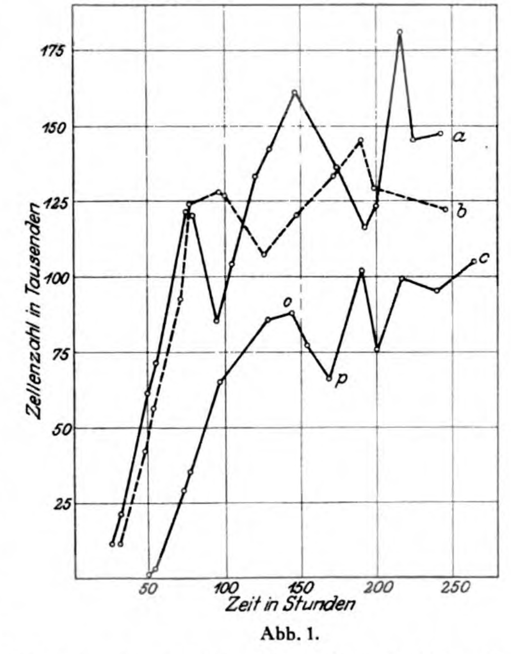


Abb. 1.

Tabelle III (Kurve c).

Hefe *Frohberg* in Würze (ohne Pepton). Temperatur: 20° C.
Impfmenge: 30 Zellen.

Zeit Stdn.	Zellenzahl in Tausenden	Mittelwerte	Differenzen	Zeit Stdn.	Zellenzahl in Tausenden	Mittelwerte	Differenzen
48	0,7			128	69		
	0,9				75		
	1,1				63		
	1,3				107		
	1,5	1,1 ± 0,06			98	86,9 ± 4,32	
	1,4				113		
	1,0				83		
	1,0				95		
	0,9		1,8 ± 0,23		79		1,4 ± 5,26
53	3,6			144	81		
	4,8				102		
	3,7				90		
	2,2				76		
	1,9	2,9 ± 0,22			103	88,3 ± 3,01	
	2,5				75		
	2,6				104		
	2,4				78		
	2,6		26,4 ± 1,43		86		10,5 ± 3,32
71	23			153	97		
	21				77		
	37				79		
	32				70		
	33	29,3 ± 1,41			78	77,8 ± 1,40	
	24				72		
	28				76		
	35				75		
	31		5,5 ± 2,02		75		11,4 ± 2,25
77	31			168	59		
	42				60		
	40				54		
	28				66		
	32	34,8 ± 1,45			68	66,4 ± 1,76	
	41				71		
	38				78		
	29				72		
	32		30,1 ± 1,97		70		35,7 ± 3,14
95	75			191	115		
	61				104		
	74				121		
	64				97		
	57	64,9 ± 1,34			92	102,1 ± 2,60	
	62				105		
	64				89		
	66				105		
	61		22,0 ± 4,52		101		26,5 ± 3,45

Tabelle III (Fortsetzung).

Zeit Stdn.	Zellenzahl in Tausenden	Mittelwerte	Differenzen	Zeit Stdn.	Zellenzahl in Tausenden	Mittelwerte	Differenzen
200	73			240	93		
	68				89		
	58				91		
	91				99		
	82	75,6 ± 2,26			108	95,3 ± 1,58	
	81				93		
	78				103		
	69				94		
	80		23,8 ± 3,22		88		9,8 ± 2,61
216	91			263	99		
	109				91		
	105				107		
	99				109		
	112	99,4 ± 2,30			118	105,1 ± 2,08	
	105				95		
	101				106		
	84				104		
	89		4,1 ± 2,79		117		

zeigt, liegen die Unterschiede an den in Frage kommenden Stellen weit außerhalb der dreifachen wahrscheinlichen Schwankung. Auch zwischen den Punkten *o* und *p* in Kurve c beträgt die Differenz 23,9 ± 3,49. Das plötzliche Abbrechen der Kurve nach rechts führt schon *Rippel* auf Autolyse zurück. Durch sie erfolgt eine Anreicherung der Kultur mit leicht assimilierbarem Stickstoff und damit eine neue starke Vermehrung. Das Wachstum einer Hefekultur ist also kein stetiges, wie das höherer Pflanzen, und daher auch die *Robertson*sche Formel dafür nicht anwendbar. Die Feststellung des weiteren Verlaufs der Kurve bis zum Absterben der Kultur steht noch aus, bietet aber erhebliche Schwierigkeiten. Wenn die Versuche über die in den Tabellen angegebenen Zeiträume ausgedehnt wurden, machte sich auch das allmähliche Verdunsten der Knlturflüssigkeit störend bemerkbar. Die wiedergegebenen Teile der Kurven können kein wirkliches Abbild des Wachstumsverlaufs der Kulturen geben, da ihnen keine kontinuierlichen Beobachtungen zugrunde liegen. Die Werte der Maxima und Minima in jeder Kurve können nur annähernd richtig sein. Es wäre Zufall, wenn ihre wirkliche Lage mit dem Zeitpunkt der jeweiligen Zählung gerade zusammengefallen wäre. An der überall in Erscheinung tretenden Grundform wird durch diesen Mangel natürlich nichts geändert.

Da es mir wiederholt erschien, als wenn die Hefezellen in einer Kultur gegen Ende kleiner würden, wurde bei dem in Tabelle II wiedergegebenen Versuch bei jeder Zählung die in einem Gesichtsfeld

liegenden Zellen mit Hilfe des *Abbe*schen Zeichenapparats gezeichnet. Die Messungen ergaben, daß der Augenschein getäuscht hatte.

Abb. 2 (dazu die Tabellen IV und V) gibt die bei niederer Temperatur (8° C) erhaltenen Kurven wieder. Die ganze Entwicklung und auch die autolytischen Vorgänge verlaufen viel langsamer; die Diffe-

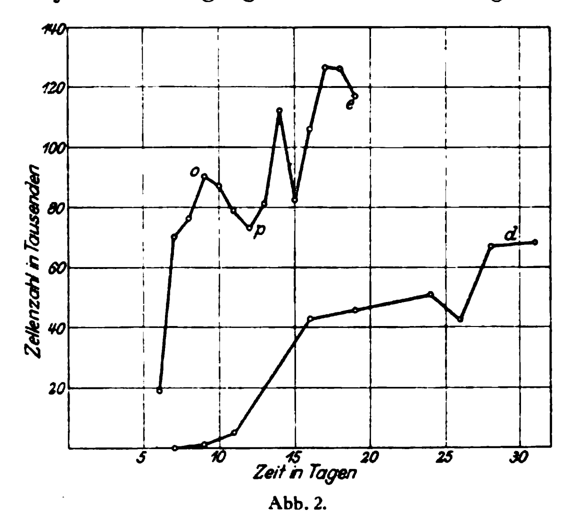


Abb. 2.

renzen zwischen den einzelnen Kurvenpunkten sind geringer und erreichen oft nicht die geforderte dreifache wahrscheinliche Schwankung. Noch einige nicht wiedergegebene Kurven geben prinzipiell dasselbe Bild wie Kurve d. Deshalb wurde eine Serie mit der zehnfachen Zellenmenge geimpft, und die diesen Versuch wiedergebende Kurve e zeigt nun die in Abb. 1 aufgetretenen Erscheinungen in gleicher Deutlichkeit. Der erste Abfall ist mit einer Differenz zwischen *o* und *p* von 16,8 ± 4,23 sichergestellt.

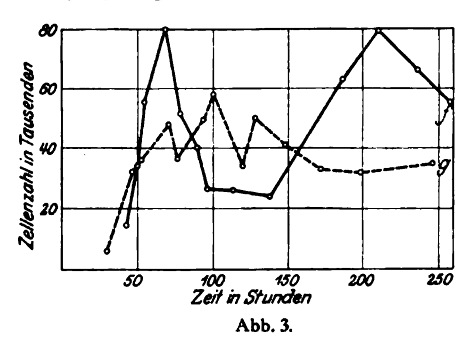


Abb. 3.

In den bei 30° C gehaltenen Kulturen (Tabellen VI und VII und Abb. 3) traten starke Unregelmäßigkeiten zwischen den einzelnen Versuchen auf, weil die Temperatur zu hoch über der optimalen und zu nahe an der maximalen lag; doch ist auch hier das gleiche Prinzip erkennbar.

Um den Einfluß der einzelnen Wachstumsfaktoren auf die Gestalt der Kurve festzustellen, müssen Kulturen ohne Würze und Pepton in

Tabelle IV (Kurve d).
Hefe *Frohberg* in Würze (9 Proz. Maltose) ohne Pepton.
Temperatur: 8° C.
Impfmenge: 30 Zellen.

Zeit Tage	Zellenzahl in Tausenden	Differenzen
7	0,2 ± 0,07	0,9 ± 0,21
9	1,1 ± 0,20	4,1 ± 0,31
11	5,2 ± 0,24	37,8 ± 3,99
16	43,0 ± 3,98	2,7 ± 5,96
19	45,7 ± 4,44	5,1 ± 5,38
24	50,8 ± 3,04	8,1 ± 6,35
26	42,7 ± 5,57	24,6 ± 8,39
28	67,3 ± 6,27	1,2 ± 6,93
31	68,5 ± 2,95	10,6 ± 4,55
36	57,9 ± 3,47	

Tabelle V (Kurve e).
Hefe *Frohberg* in Würze (9 Proz. Maltose) ohne Pepton.
Temperatur: 8° C. Impfmenge: 300 Zellen (zehnfache Menge).

Zeit Tage	Zellenzahl in Tausenden	Differenzen
6	19,3 ± 0,47	51,1 ± 0,77
7	70,4 ± 0,62	6,0 ± 2,34
8	76,4 ± 2,26	13,7 ± 3,35
9	90,1 ± 2,47	2,6 ± 3,28
10	87,5 ± 2,16	8,7 ± 4,41
11	78,8 ± 3,84	5,5 ± 5,16
12	73,3 ± 3,44	7,7 ± 4,19
13	81,0 ± 2,39	31,0 ± 3,99
14	112,0 ± 3,19	30,0 ± 3,76
15	82,0 ± 1,99	24,0 ± 8,71
16	106,0 ± 8,48	19,4 ± 9,10
17	126,6 ± 3,30	0,6 ± 8,67
18	126,0 ± 7,96	8,4 ± 9,56
19	117,6 ± 5,29	

Tabelle VI (Kurve f).
Hefe *Frohberg* in Würze (9 Proz. Maltose) ohne Pepton.
Temperatur: 30° C.
Impfmenge: 30 Zellen.

Zeit Stdn.	Zellenzahl in Tausenden	Differenzen
42	14,6 ± 1,83	19,2 ± 1,85
49	34,2 ± 0,32	21,2 ± 1,56
54	55,4 ± 1,53	24,5 ± 3,04
68	79,9 ± 2,63	28,9 ± 3,30
78	51,0 ± 1,99	10,6 ± 2,37
89	40,4 ± 1,29	13,9 ± 2,27
96	26,5 ± 1,88	0,2 ± 2,64
113	26,7 ± 1,85	2,3 ± 2,17
138	24,4 ± 1,14	39,2 ± 1,66
186	63,6 ± 1,13	15,3 ± 3,20
210	78,9 ± 3,00	12,5 ± 4,15
236	66,4 ± 2,86	11,1 ± 3,15
258	55,3 ± 1,33	

Tabelle VII (Kurve g).
Hefe *Frohberg* in Würze (9 Proz. Maltose) ohne Pepton.
Temperatur: 30° C.
Impfmenge: 30 Zellen.

Zeit Stdn.	Zellenzahl in Tausenden	Differenzen
30	5,7 ± 0,52	26,5 ± 1,07
46	32,2 ± 0,94	4,1 ± 2,00
52	36,3 ± 1,77	12,4 ± 3,20
70	48,7 ± 2,67	12,2 ± 3,06
77	36,5 ± 1,50	12,5 ± 2,91
94	49,0 ± 2,49	9,0 ± 3,44
101	58,0 ± 2,37	24,2 ± 4,50
120	33,8 ± 3,82	16,9 ± 4,11
127	50,7 ± 1,51	9,8 ± 2,89
148	40,9 ± 2,46	7,4 ± 3,93
172	33,5 ± 3,06	1,0 ± 3,30
198	32,5 ± 1,24	2,8 ± 3,15
246	35,3 ± 2,90	

rein mineralischen Nährlösungen, deren Zusammensetzung man vollkommen in der Hand hat, angelegt werden. Dahingehende Versuche führten noch zu keinem Ergebnis, da bei der geringen Impfmenge kein gleichmäßiges Wachstum der Kulturen erfolgte, oft sogar ganz ausblieb. Wenn die mit Hefe geimpften Röhrchen mit Sporen von Aspergillus oder einem anderen Pilz infiziert wurden, wuchsen sie regelmäßig normal an, und dann auch normal weiter, wenn das kleine

Pilzräschen entfernt wurde. Doch können diese unter anderem auch von *H. Naumann*[1]) behandelten und mit *Wildiers* Bioslehre in Beziehung stehenden Fragen jetzt hier nicht weiter verfolgt werden.

Zusammenfassung.

Die Zellvermehrung in Hefekulturen wurde durch Zählung unter eingehender Berücksichtigung der Fehlerquellen festgestellt und die Ergebnisse in mehreren Tabellen und Kurven niedergelegt. Die Wachstumskurve ist unsymmetrisch und mehrgipfelig, wahrscheinlich eine Folge autolytischer Vorgänge. Nach dem ersten Maximum tritt ein plötzlicher Abfall ein, dem ein erneuter Anstieg folgt, der regelmäßig über das erste Maximum hinausgeht. Dieser Vorgang kann sich mehrmals wiederholen. Eine Anwendung der *Robertson*schen Wachstumsformel auf den Gesamtverlauf des Wachstums einer Hefekultur ist daher nicht möglich.

[1]) *H. Naumann*, Zeitschr. f. techn. Biologie 7, 1919.

Über den Zusammenhang von Fettspaltvermögen und Cholesterinspiegel im Blutserum bei Hypertonien.

Von

M. Dörle und **H. v. Weiss.**

(Aus der medizinischen Universitäts-Poliklinik Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 13. November 1925.)

Untersuchungen von *Edelmann* 1923 aus der hiesigen medizinischen Poliklinik ergaben, daß eine experimentelle Hypercholesterinämie, wie sie bei Tieren leicht durch Verfüttern von Cholesterinoleat hervorzurufen ist, das Fettspaltvermögen des Serums stark herabsetzt, offenbar durch adsorptive Bindung der Serumlipase an Cholesterin. Diese Annahme erscheint durch die Versuche von *Dörle* (1923) über das Verhalten von Cholesterin zu anderen Fermenten (Pepsin, Trypsin usw.) bestätigt.

In vorliegender Arbeit wollten wir feststellen, wie sich die Serumlipase bei verschiedenen Krankheitszuständen verhält, die mit Hypercholesterinämie verbunden sind, wie bei Arteriosklerose und essentieller Hypertonie, bei denen *Weltmann* 1912, *Bacmeister* und *Henes*, *Schmidt*, *Pribram* u. a. einen erhöhten Cholesteringehalt des Serums gefunden haben.

Die Methodik unserer Untersuchungen über die Spaltfähigkeit des Serums war die von *Rona* und *Michaelis*. Im folgenden geben wir als „*Spaltvermögen*“ der untersuchten Seren die Tropfenzahl, um die sich 10 ccm einer gesättigten, frisch bereiteten Tributyrinlösung vom Zusatz von 0,5 ccm Serum bis zum Aufhören der Spaltwirkung vermindert hat. Die Seren wurden aus Venenblut gewonnen.

Zunächst bestimmten wir Blutdruck und Spaltvermögen der Seren bei sieben jüngeren, gesunden Versuchspersonen. Die Grenzwerte waren hier für den systolischen Blutdruck 115 bis 136 mm Hg, für das Spaltvermögen 5 bis 10 Tropfen.

Danach wurden zunächst 14 poliklinische Kranke ohne Auswahl besonderer Fälle mit verschiedenen Blutdruckhöhen untersucht. Die Ergebnisse zeigt Tabelle I.

Tabelle I.

Nr.	Patient	Alter Jahre	Krankheit	Blutdruck	Spaltvermögen
1	Herr *K.*	19½	Tbc. Pulm.	120–90	7
2	Frl. *R.*	19	Trig. neuralg.	115–80	6
3	„ *St.*	38	Neurasthenie	130–90	8
4	„ *L.*	60	Herzneurose	160–90	6
5	Frau *P.*	63	Mastoiditis	150–95	9
6	„ *M.*	42	Diabetes	135–85	11
7	„ *R*	58	Essent. Hypertonie und Diabetes	205–140	8
8	„ *M.*	46	Tabes dorsalis	130–90	4
9	„ *F.*	56	Lues 3	130–95	2½
10	Herr *P.*	46	Luet. Aortenin.	150–90	6
11	Frau *K.*	40	Icterus luet.	130–90	2
12	„ *B.*	60	Lues cerebri	135–95	0
13	Herr *St.*	39	Lues 3	130–85	0
14	„ *Sch.*	46	Ang. pect. vasom.	125–75	2½

In dieser Tabelle ist zunächst auffallend das hohe Spaltvermögen der beiden Diabetesfälle, obwohl der eine den hohen Blutdruck von 205—140 mm Hg hat. Auf diesen Fall ist später noch zurückzukommen. Ferner ist auf das zum Teil sehr niedere Spaltvermögen der Luesfälle hinzuweisen. Letzteres Ergebnis stimmt überein mit den Untersuchungen *Bauers* 1912.

Tabelle II.

Nr.	Patient	Alter Jahre	Krankheit	Blutdruck	Spaltvermögen
15	Frau *S.*	64	Nierensklerose	210–150	1
16	„ *H.*	78	Allg. Arterioskl.	210–100	½
17	Herr *H.*	60	„ „	200–130	0
18	Frau *W.*	62	„ „	200–160	1
19	„ *H.*	64	Aploplexie	185–160	1
20	Herr *F.*	60	Allg. Arterioskl.	180–120	2½
21	„ *H.*	78	Aortensklerose	180–100	0
22	„ *M.*	66	Arteriensklerose	180–100	0
23	„ *O.*	70	„	175–135	0
24	Frau *R.*	40	Nierensklerose	175–120	0
25	Herr *X.*	60	Arteriosklerose	175–90	0
26	Frau *K.*	68	Apoplexie	175–110	2
27	Herr *Z.*	67	Arteriosklerose	175–90	0
28	Frau *R.*	61	„	165–80	½
29	Herr *R.*	65	Arterioskl. Icter.	155–80	0
30	„ *Sch.*	50	Apoplexie	150–90	0
31	Frau *D.*	56	Ang. pectoris	145–90	1½
32	„ *J.*	50	Arteriosklerose	145–90	½
33	Herr *Ch.*	66	„	140–80	3½
34	„ *B.*	60	„	140–90	5
35	Frau *S.*	53	Essent. Hypertonie	220–100	0
36	„ *R.*	58	„ „	185–120	1½
37	„ *S.*	51	„ „	175–130	1½
38	„ *K.*	46	„ „	175–100	2

Die Tabelle II umfaßt die Untersuchungen an 20 klinischen Arteriosklerosen mit verschieden hohem systolischen Blutdruck (210 bis 140) und bei vier essentiellen Hypertonien.

Tabelle II läßt bei ausgeprägter Arteriosklerose und essentieller Hypertonie eine Parallelität von Blutdruck und Spaltvermögen in dem Sinne erkennen, daß mit steigendem Blutdruck das Fettspaltvermögen des Serums abnimmt bzw. aufhört.

Die Untersuchung an sechs alten Leuten ohne stärkere klinische Erscheinungen von Arteriosklerose ergibt damit übereinstimmend ein Spaltvermögen, das sich der Norm nähert.

Tabelle III.

Nr	Patient	Alter Jahre	Krankheit	Blutdruck	Spaltvermögen
39	Frau *R.*	78	Emphysenbronch.	130–90	5
40	„ *S.*	71	Bronchitis	155–110	6
41	Herr *H.*	60	Tracheobronch.	155–110	5
42	Frau *H.*	59	Bronchitis	135–90	3
43	„ *M.*	70	„	140–90	$3^1/_2$
44	„ *Ch.*	70	„	155–70	3

Eine Zusammenfassung der bisherigen Untersuchungsergebnisse ergibt somit:

1. erhöhtes Fettspaltvermögen bei den beiden Diabetesfällen (6 und 7). Bei Fall 7 ist bemerkenswert, daß das anfangs trotz Hypertonie hohe Spaltvermögen nach Aufhören der Zuckerausscheidung bei Weiterbestehen der Hypertonie von 8 auf $1\frac{1}{2}$ absank. Daraus geht hervor, daß hier der erhöhte stoffliche Umsatz bei Diabetes trotz bestehender Hypertonie, die ein herabgesetztes Spaltvermögen bedingt hätte, eine erhöhte Spaltfähigkeit des Serums hervorrief, die mit dem Aufhören der Zuckerausscheidung verschwand;

2. ein verhältnismäßig niederes Spaltvermögen bei Luetikern auch bei niederem Blutdruck;

3. ein Absinken des Spaltvermögens des Serums mit steigendem Blutdruck bei Arteriosklerose und essentieller Hypertonie.

Nach diesen bisherigen Ergebnissen erschien es uns nun vor allem wichtig, festzustellen, ob ein ursächlicher Zusammenhang besteht zwischen geringem Spaltvermögen und einer Hypercholesterinämie des Serums. Wir bestimmten deshalb in den weiteren Untersuchungen neben dem Fettspaltvermögen auch den Cholesterinspiegel des Serums (Methode *Authenrieth-Funk*). Es wurden untersucht: sieben Fälle von Arteriosklerose, vier Fälle von essentieller Hypertonie und zwei Fälle von Bronchitis, die uns als Kontrollen dienten.

Tabelle IV.

Nr.	Patient	Alter Jahre	Krankheit	Blutdruck	Spaltvermögen	Cholesterin in 100 ccm Serum mg
45	Frau *W.*	62	Arteriosklerose	200–140	1	282
46	„ *K.*	60	Apoplexie	175–110	2	272
47	Herr *B.*	60	Arteriosklerose	175–95	0	260
48	„ *O.*	70	„	170–110	0	248
49	Frau *K.*	61	„	170–90	1½	230
50	Herr *S.*	48	Apoplexie	135–90	2	214
51	„ *F.*	59	Arteriosklerose	140–90	5	168
52	Frau *S.*	56	Essent. Hypert.	260–150	0	280
53	„ *R.*	57	„ „	180–120	1½	254
54	„ *R.*	53	„ „	175–120	0	240
55	„ *K.*	46	„ „	175–110	2	210
56	Herr *S.*	26	Bronchitis	125–80	7	148
57	„ *M.*	38	„	130–90	8	136

Die in Tabelle IV aufgezeichneten Ergebnisse zeigen, daß Blutdrucksteigerung und Erhöhung des Cholesterinspiegels über den Normalwert mit einer Verminderung des Spaltvermögens verbunden sind. Fall 51 zeigt bei normalem Cholesterinspiegel nahezu normales Spaltvermögen des Serums. Fall 56 und 57 sind Normalkontrollen.

Noch deutlicher zeigt sich dieser Zusammenhang bei den in Tabelle V dargestellten Untersuchungen von unter Jodtherapie stehenden Patienten.

Eine mit der von uns benutzten Methode nachweisbare Wirksamkeit der Jodtherapie war nach den Untersuchungen von *Quarelli* und *Ivaldi* 1914 zu erwarten. Diese Autoren konnten einen fördernden Einfluß des Jods auf den Gesamtstoffwechsel feststellen. Tabelle V zeigt in fortlaufenden Untersuchungen die Einwirkung der Jodtherapie (dreimal täglich 0,3 Dijodyl) bei fünf Arteriosklerotikern auf Blutdruck und Fettspaltvermögen. Bei sechs weiteren Fällen ist außerdem der Cholesterinspiegel bestimmt.

Tabelle V zeigt, daß bei Eintreten einer klinischen Besserung mit steigendem Spaltvermögen der Cholesterinspiegel sinkt. Bei Unwirksamkeit der Jodtherapie bleiben diese Veränderungen aus. Es ist bemerkenswert, daß bei Versuchen an einem gesunden 30jährigen Manne trotz der gleichen Jodmedikation bei mehrmaliger Untersuchung keinerlei Änderung des hier sehr hohen (10) Fettspaltvermögens eintrat.

Das Ergebnis unserer Untersuchungen läßt sich somit wie folgt zusammenfassen:

1. Bei Arteriosklerose und essentieller Hypertonie ist das Fettspaltvermögen des Blutserums herabgesetzt oder aufgehoben. Der Cholesterinspiegel ist dabei erhöht.

Tabelle V.

Nr.	Patient Datum	Alter Jahre	Krankheit	Blutdruck	Spalt-vermögen	Cholesterin in 100 ccm Serum mg
58	Frau *D.*	56	Nierensklerose	150–110	3	—
	28. X. 25.		Eiweiß +			
	10. XI.		Besserung	145–90	7	—
	4. XII.		„	150–90	6	—
			Eiweiß —			
59	Frau *F.*	74	Arteriosklerose	169–100	4	—
	4. II. 24.					
	27. II.		Klin. Besserung	140–100	8	—
60	Herr *Z.*	56	Ang. pectoris	135–90	1	—
	12. II. 24.					
	21. II.		„ „	135–90	2	—
	29. II.		Besserung	135–80	6	—
	15. III.		Anfallsfrei	115–80	6	—
61	Herr *Z.*	67	Arteriosklerose	170–130	1	—
	15. XII. 24.					
	8. I. 25.		Besserung	170–100	7	—
62	Frau *S.*	53	Essent. Hypert.	210–110	0	—
	25. XI. 24.					
	17. XII.		Besserung	170–90	2½	—
63	Frau *K.*	68	Aploplexie	175–110	2½	272
	2. XII. 24.					
	17. XII.		„	175–100	2½	260
	6. I. 25.		Besserung	160–100	5	200
64	Herr *D.*	56	Ang. pectoris	145–90	1½	218
	15. XII. 24.					
	8. I. 25.		Besserung	140–90	7	88
65	Herr *Z.*	67	Arteriosklerose	185–100	1	230
	19. XII. 24.					
	8. I. 25.		Klin. Besserung	170–100	7	124
66	Herr *L.*	55	Arteriosklerose	150–70	0	210
	20. XII. 24.					
	7. I. 25.		„	149–70	6	120
67	Frau *R.*	40	Nierensklerose	175–120	0	240
	20. XII. 24.					
	10. I. 25.		„	160–100	4½	120
68	Frau *Sch.*	64	Nierensklerose	210–100	1	280
	30. XI. 24.					
	12. XII.		„	210–100	0	280
	19. XII.		„	230–100	0	280
	4. I. 25.		„	230–100	0	288

2. Bei arteriosklerotischer Hypertonie nimmt unter dem Einfluß der Jodtherapie, wenn klinische Besserung erzielt wird, das Fettspaltvermögen des Serums zu, während der Cholesterinspiegel sinkt.

3. Bei fehlender Jodwirkung und stationärer Hypertonie bleibt der Cholesterinspiegel erhöht bei gleichbleibendem niederen Spaltvermögen.

Literatur.

1) *Bacmeister* und *Henes*, Deutsch. med. Wochenschr. 1913, H. 12. — 2) *J. Bauer*, Wien. klin. Wochenschr. 1912, S. 1376. — 3) *M. Dörle*, Zeitschr. f. exper. Med. **84**, 1923. — 4) *F. Edelmann*, ebendaselbst **85**. — 5) *H. Pribram*, Zentralbl. f. inn. Med. **21**, 1915. — 6) *Quarelli* und *Ivaldi*, Gazz. med. Ital. 1914. — 7) *P. Rona* und *L. Michaelis*, diese Zeitschr. **81**, 1911. — 8) *H. B. Schmidt*, Arch. of intern. Med. 1914, S. 8. — 9) *O. Weltmann*, Wien. klin. Wochenschr. 1913, H. 22.

Neue Versuche über den Stickstoffumsatz in den Nervenzentren.

Von

Hans Winterstein und Else Hirschberg.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 13. November 1925.)

Unsere ersten Untersuchungen[1]) hatten das Vorhandensein eines beträchtlichen N-Umsatzes im Ruhe- und Reizstoffwechsel der Nervenzentren (isoliertes Froschrückenmark) ergeben. Über die Art der umgesetzten Substanzen konnten zunächst keine Aussagen gemacht werden. Harnstoff oder Harnsäure waren nicht nachweisbar. Spätere (im Anschluß an *Tashiros* Beobachtungen am peripheren Nerven) durchgeführte Untersuchungen[2]) ergaben das Vorhandensein einer Ammoniakbildung, die aber nur einige Prozent des Gesamt-N-Umsatzes ausmachte. Wir haben nunmehr in neuen Versuchen, die durch die verfeinerte Methodik der kolorimetrischen N-Bestimmung mittels direkter Nesslerisation ermöglicht wurden, genaueren Aufschluß über die im Ruhe- und Reizstoffwechsel unter verschiedenen Bedingungen sich abspielenden Umsetzungen N-haltigen Materials Aufschluß zu erhalten gesucht.

Da der Vergleich der NH_3-Bildung im peripheren und zentralen Nervensystem den Gedanken nahegelegt hatte, daß in dem letzteren das primär gebildete Ammoniak zum Teil in ein anderes Ausscheidungsprodukt umgewandelt würde, wurde zunächst nochmals der Nachweis von Harnstoff in der die Stoffwechselendprodukte des isolierten Zentralnervensystems (ZNS) des Frosches enthaltenden Lösung versucht. Das Resultat war jedoch auch bei Verwendung der sehr empfindlichen Xanthydrolreaktion wieder durchaus negativ. Wir wandten uns nunmehr der Untersuchung des mit Formol titrierbaren Stickstoffs zu, und konnten, da sich die Mikromethodik hier gut brauchbar erwies, nicht bloß das Vorhandensein von NH_2-N in der zur Aufbewahrung

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**, 212, 1918.

[2]) Diese Zeitschr. **156**, 138, 1925.

des überlebenden ZNS dienenden Versuchsflüssigkeit nachweisen[1]), sondern in dieser nebeneinander bestimmen: 1. die Menge des NH_3-N, 2. die Menge des NH_2-N, 3. und 4. durch Mikrokjeldahl mit direkter Nesslerisation die Menge des Gesamt-N vor und nach Enteiweißung der Lösung mit Sulfosalicylsäure, dadurch also den Total-N und den Eiweiß-N. *Hansteen-Cranner*[2]) hat die grundlegende Entdeckung gemacht, daß in der pflanzlichen Membran ein Teil der Lipoide *wasserlöslich* ist und bei längerem Aufenthalt in das umgebende Wasser übergeht. *Biedermann*[3]) hat die gleiche Beobachtung am Muskel anstellen können, und wir fanden diese überaus wichtige Tatsache, auf deren Bedeutung an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll, auch am ZNS bestätigt. In der Folge wurde dann außer den bereits genannten Fraktionen in einer weiteren noch die Menge der an die NaCl-Lösung abgegebenen *Lipoide* bestimmt.

Methodik.

Im einzelnen gestaltete die Methodik sich folgendermaßen: Das in der üblichen Weise isolierte ZNS des Frosches wird während einer bestimmten Zeit (meist 8 oder 24 Stunden) in 6 ccm physiologischer NaCl-Lösung gehalten, durch die kontinuierlich Sauerstoff hindurchperlt. Das von dem O-Strom mitgeführte Ammoniak wird in einer mit 4 ccm n/100 H_2SO_4 beschickten Vorlage aufgefangen. Am Schlusse des Versuchs wird der Inhalt mit ½ ccm *Nesslers* Reagens + ½ ccm 10proz. NaOH versetzt und in dem vortrefflichen *Bürker*schen Kolorimeter der Firma Leitz mit einer $(NH_4)_2SO_4$-haltigen Standardlösung von bekanntem N-Gehalt (1 ccm = 0,003 bis 0,009 mg N) verglichen, deren Zusammensetzung im übrigen (hier wie auch in allen sonstigen Bestimmungen) mit jener der zu untersuchenden Flüssigkeit genau übereinstimmt, also die gleiche Menge NaOH, H_2SO_4 und *Nessler* in der gleichen Flüssigkeitsmenge enthält; dadurch sind alle durch einen etwaigen Eigengehalt der NaCl-Lösung oder

---

[1]) Untersuchungen über die Menge des von dem isolierten ZNS der Kröte ausgeschiedenen formoltitrierbaren Stickstoffs sind bereits vor einiger Zeit von *E. Sereni* (Arch. di Fisiol. **19**, 163, 1921) mitgeteilt worden. Die veröffentlichten Daten sind jedoch völlig unmöglich. Danach soll ein Präparat bis zum Erlöschen der Erregbarkeit 0,0378 bis 0,0980, im Mittel 0,0685 g „Aminosäuren" ausscheiden. Ganz abgesehen davon, daß es unerfindlich ist, wie die Menge der ihrer Natur nach ja nicht bestimmten Aminosäuren berechnet werden konnte, ergibt sich die Absurdität dieses Resultats aus einer einfachen Überlegung: Obwohl hierüber keinerlei Zahlenwerte mitgeteilt sind, kann man, zumal die kleineren Kröten*männchen* verwendet wurden, auf Grund unserer Erfahrungen an Fröschen annehmen, daß das Gewicht eines ZNS 0,2 g wohl kaum überschritten hat. Rechnet man den mittleren Wassergehalt auch nur zu zwei Drittel, so würde die *Gesamtmenge der Trockensubstanz* im Mittel 0,067 g betragen haben, das ist weniger als die Menge „Aminosäuren", die es ausgeschieden haben soll!

[2]) Meldinger fra Norges Landbrukshøiskole **2**, 1. u. 2. Heft, 1922.

[3]) Pflügers Arch. **202**, 223, 1924.

der Reagenzien an NH_3 entstehenden Fehlerquellen ausgeschaltet. Damit ferner die Flüssigkeiten den gleichen Farbenton erhalten, muß das Licht, ehe es die Standardlösung passiert, noch durch eine Schicht „*Nessler*-Wasser" hindurchgehen, d. h. Flüssigkeit, die sich von den zu vergleichenden nur durch das Fehlen von NH_3 unterscheidet; umgekehrt passiert das Licht, das durch die Untersuchungsflüssigkeit hindurchgegangen ist, gleichfalls eine Schicht „*Nessler*-Wasser". In ganz analoger Weise wird in 1 ccm der Versuchs-NaCl-Lösung der Gehalt an dem nicht durch den O-Strom übergetriebenen NH_3 bestimmt, dessen Menge ausnahmslos um das Vielfache größer war.

In weiteren 3 ccm der Versuchslösung wird der Gehalt an NH_2-N nach *Sörensen* bestimmt. Das Verfahren erwies sich in der folgenden Form als Mikromethode brauchbar: Die 3 ccm Lösung werden mit 1 ccm der *Sörensen*schen Formollösung (vgl. *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, 9. Aufl., 1924, S. 582) versetzt und direkt mit 0,02 n NaOH gegen Phenolphthalein titriert, indem zuerst aus einer in $^1/_{100}$ ccm geteilten Pipette eine abgemessene Menge zugesetzt und dann aus einer in $^1/_{1000}$ ccm geteilten Pipette bis zur *End*färbung titriert wird. 3 ccm der gleichen, aber nicht zu dem Versuch verwendeten NaCl-Lösung werden in der gleichen Weise titriert und dieser Wert von dem ersteren abgezogen (1 ccm NaOH = 0,28 mg N).

Schließlich wird in zwei Teilen des Restes der Versuchsflüssigkeit der Gesamt-N-Gehalt bestimmt, und zwar in ½ bis 1 ccm direkt, in 1 ccm nach vorangegangener Enteiweißung. Diese erfolgt in der Weise, daß der 1 ccm NaCl-Lösung mit ½ ccm 3proz. Sulfosalicylsäure versetzt und dann durch ein Jenaer gesintertes Glasfilter filtriert wird; es wird mit ½ ccm Wasser nachgewaschen und 1 ccm des Filtrats zur *Kjeldahl*-Bestimmung verwendet. Die Differenz der beiden Werte gibt die Menge des *Eiweiß*-N. Die N-Bestimmung erfolgt in beiden Fällen in der Weise, daß nach dem von *Koch* und *Mc Meckin*[1]) empfohlenen Verfahren die genannte Menge der Untersuchungsflüssigkeit in einem kleinen *Kjeldahl*-Kolben mit ½ bis 1 ccm *Kjeldahl*-Säure versetzt und tropfenweise 30proz. H_2O_2-Lösung zugefügt wird. Nach erfolgter Verbrennung wird der Rückstand unter Wasserkühlung mit Wasser verdünnt, in ein 25-ccm-Meßkölbchen aus Jenaer Glas überführt, unter Eiskühlung mit 5 ccm 10proz. NaOH und ½ ccm *Nesslers* Reagens versetzt und dann bis zur Marke aufgefüllt. Die zur kolorimetrischen Bestimmung dienende Vergleichs-Standardlösung wird so hergestellt, daß 3 ccm $(NH_4)_2SO_4$-Lösung von bekanntem Titer (s. oben) mit 5 ccm 10proz. NaOH und ½ ccm *Nessler* versetzt und gleichfalls in einem Meßkölbchen auf 25 ccm aufgefüllt werden. In der gleichen Weise, nur ohne $(NH_4)_2SO_4$ ist das *Nessler*-Wasser zusammengesetzt. (Unter Wasser ist stets *Kahlbaum*sches Leitfähigkeitswasser zu verstehen.)

Der N-Gehalt der nicht enteiweißten Lösung plus dem N des durch den O-Strom übergetriebenen NH_3 ergibt den *Gesamtumsatz* an Stickstoff.

In den späteren Versuchen wurde, wie schon erwähnt, in einer gesonderten Fraktion die Menge des an die Aufbewahrungsflüssigkeit abgegebenen *Lipoidstickstoffs* bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde die Gesamtmenge der Versuchsflüssigkeit auf 8 ccm erhöht und von diesen 6 ccm in der eben geschilderten Weise und 1 ccm auf seinen Gehalt an Lipoid-N untersucht: 1 ccm der filtrierten Versuchslösung wird zur Trockne ein-

[1]) Journ. Amer. Chem. Soc. **46**, 2066, 1924; zitiert nach Ber. ü. d. ges. Physiol. **29**, 514.

gedampft, dann mit etwa 5 ccm absoluten Alkohols am Rückflußkühler 30 bis 60 Minuten lang extrahiert, noch heiß durch ein Glasfilter filtriert, der Alkohol abdestilliert und der Rückstand mit Kjeldahlsäure unter wiederholtem Zusatz von H_2O_2 in einem *Schott*schen Reagenzglas verbrannt. Die Verbrennung erfolgt sehr langsam, unvergleichlich schwerer als die der ursprünglich vorhandenen gelösten Lipoide, ein klarer Beweis, daß durchaus entsprechend den Angaben von *Hansteen-Cranner* (a. a. O.) durch die sogenannten Lipoidlösungsmittel eine *vollkommene Änderung der natürlichen Beschaffenheit* zum mindesten *der wasserlöslichen Lipoide* bewirkt wird. Nach beendeter Verbrennung wird die nun farblose Flüssigkeit genau so wie oben behandelt und der N-Gehalt durch Nesslerisation kolorimetrisch bestimmt.

Versuchsergebnisse.

Die Resultate unserer Untersuchungen können am besten an der Hand einer Reihe von Tabellen erörtert werden.

A. Ruhestoffwechsel (in O-NaCl-Lösung).

Tabelle I.

Ruhestoffwechsel des ungeteilten ZNS in Milligrammen pro 1 g (Temperatur = 18,5 bis 22,5°).

Nr.	Versuchsdauer Stdn.	NH_3-N	NH_2-N	Eiweiß-N	Lipoid-N	Total-N
1	24	0,125	0,52	0,60	nicht bestimmt	2,315
2	24	0,15	0,62	0,30	0,64	2,14
3	8	0,10	0,56	0,16	nicht bestimmt	1,01
4	8	0,09	0,60	0,09	" "	1,06
5	8	0,12	0,60	0,18	" "	1,01

Die beiden über 24 Stunden ausgedehnten Versuche ergaben einen N-Umsatz von mehr als 2 mg pro 1 g der frischen Substanz, wie er im Mittel auch bei unseren ersten Untersuchungen (a. a. O.) beobachtet worden war. Dagegen ergaben im Gegensatz zu den damaligen Befunden die achtstündigen Versuche einen relativ erheblich größeren Umsatz, da dieser nicht ein Drittel, sondern etwa die Hälfte des 24-Stunden-Umsatzes betrug.

In einer größeren Zahl von Versuchen wurde, um den Stoffwechsel unter verschiedenen Bedingungen an ein und demselben Präparat vergleichen zu können, das ZNS quer geteilt, so daß die obere Hälfte Gehirn und Kopfmark, die untere das Rückenmark umfaßte. Die beiden ersten Versuche der folgenden Tabelle, in denen diese Untersuchung an den beiden Hälften *desselben* ZNS ausgeführt wurde, zeigen (entsprechend dem, was wir bereits früher für den Gesamtumsatz gefunden hatten), daß der N-Umsatz der beiden Hälften, auf die Gewichtseinheit bezogen, keine nennenswerten Unterschiede aufweist, ein

Vergleich beider mithin zulässig erscheint[1]). Die folgenden Versuche 3 bis 10 der Tabelle II sind im Juli bei meist recht hoher Außentemperatur angestellt, und der Gesamt-N-Umsatz ist während der durchweg achtstündigen Versuchsperiode ebenso groß oder noch größer als in den oben erwähnten 24stündigen Versuchen, nämlich 2 bis 3 mg pro 1 g.

Tabelle II.
Ruhestoffwechsel des quer geteilten ZNS in Milligrammen pro 1 g und 8 Stunden.

Nr.	t^0	Hälfte	NH_3·N	NH_2·N	Eiweiß·N	Lipoid·N	Total·N
1	18,5—19,7	obere	0,14	0,58	0,35	nicht bestimmt	1,04
		untere	0,14	0,61	0,32		1,14
2	19,5	obere	0,15	0,59	0,10	0,61	1,02
		untere	0,17	0,54	0,09	0,63	1,09
3	24,1—24,6	„	0,17	0,65	0,27	0,63	2,51
4	26,7—28,5	„	0,18	0,85	0,43	0,84	3,06
5	24,5	obere	0,19	0,71	0,29	0,87	2,63
6	27,4—28,8	„	0,20	0,80	0,38	0,75	3,03
7	26,0—27,6	untere	0,15	0,70	0,34	0,72	2,42
8	23,5	„	0,15	0,64	0,40	0,55	2,62
9	21	„	0,17	0,96	0,23	0,76	2,35
10	21,5	obere	0,16	0,79	0,22	0,71	2,24

Fassen wir die Versuche 3 bis 10 dieser Tabelle als die am besten untereinander vergleichbaren zusammen, so ergeben sich die folgenden Mittelwerte für den Ruheumsatz in 8 Stunden:

	NH_3·N	NH_2·N	Eiweiß·N	Lipoid·N	Total·N
In mg pro 1 g Substanz	0,17	0,76	0,32	0,73	2,61
In Proz. des Gesamt-N-Umsatzes	6,5	29,1	12,3	28,0	100

Von dem Gesamtumsatz an N entfällt mithin der Hauptteil auf den formoltitrierbaren N und auf den N wasserlöslicher Lipoidstoffe. Die Menge des NH_3-N betrug im Mittel nur etwa 6,5 Proz., ein Wert, der mit dem in unserer früheren Mitteilung errechneten Mittel von 7,7 Proz. gut übereinstimmt. Nicht sehr beträchtlich ist auch die Menge des in die umgebende Lösung übergehenden Eiweißes, wenigstens unter normalen Bedingungen. In drei Versuchen an *kranken* Fröschen dagegen war die Eiweißabgabe bedeutend gesteigert und betrug 50

[1]) Trotz der guten Übereinstimmung der Versuche untereinander müssen doch methodische Fehler vermutlich bei der Bestimmung des Gesamt-N vorliegen, da dessen Menge im Gegensatz zu allen folgenden Versuchen geringer gefunden wurde als die Summe der einzelnen N-Fraktionen.

bis 55 Proz. des Gesamt-N-Umsatzes. Auf den Gehalt an Lipoiden hatte die Enteiweißung der Versuchsflüssigkeit *keinen* Einfluß, wie die folgende Tabelle zeigt, in der der Gehalt an Lipoid-N in Proben derselben Versuchsflüssigkeit vor und nach ihrer Enteiweißung verglichen ist. Die Werte stimmen untereinander vollständig überein. Die wasserlöslichen Lipoide gelangen mithin *nicht in Form koagulabler Eiweißverbindungen* zur Abgabe.

Vergleich des Gehalts der Versuchsflüssigkeit an Lipoid-N vor und nach Enteiweißung.

Nr.	1	2	3	4	5	6*)	7*)
Vor Enteiweißung	0,63	0,70	0,64	0,61	0,63	1,17	1,13
Nach Enteiweißung . . .	0,63	0,63	0,63	0,60	0,63	1,17	1,12

*) Reizversuche.

Subtrahiert man von der direkt bestimmten Gesamtabgabe an N die Summe der einzelnen N-Fraktionen, so ergibt sich ein Defizit von im Mittel 24 Proz., das von N noch nicht näher bekannter Substanzen herrühren muß (s. unten).

B. Reizstoffwechsel (in O-NaCl-Lösung).

Die Wirkung der Reizung in O-haltiger NaCl-Lösung auf den N-Umsatz ist aus der Tabelle III ersichtlich. Die Versuche 1 bis 3 sind am ungeteilten ZNS von Fröschen angestellt. Die Tiere waren etwas matt, im Beginn einer Erkrankung, der später eine größere Zahl von Fröschen zum Opfer fiel. In den Versuchen 4 und 5 ist die Wirkung der Reizung an je zwei Hälften desselben quer geteilten ZNS verglichen; wie in den Versuchen 1 und 2 der Tabelle II stimmen auch hier die Werte untereinander vollständig überein, so daß auch der Erregungsstoffwechsel des Gehirns und des Rückenmarks keine Differenzen erkennen läßt. Die Reizung erfolgte hier wie auch in unseren früheren Versuchen durch kurze Perioden tetanisierender Induktionsschläge, die durch eine elektrische Kontaktuhr ausgelöst wurden. Die Versuchsdauer betrug in sämtlichen Versuchen 8 Stunden, die Temperatur 21,2 bis 23,7°. Die drei ersten Versuche sind im Juni, die beiden anderen im Juli angestellt.

Tabelle III.

Reizstoffwechsel des ZNS in Milligrammen pro 1 g und 8 Stunden.

Nr.	Präparat	NH_3-N	NH_2-N	Eiweiß-N	Lipoid-N	Total-N
1	ganzes ZNS	0,12	2,23	1,33	nicht bestimmt	9,40
2	„ „	0,14	2,27	1,56		9,36
3	„ „	0,15	2,58	1,03		8,63
4	obere Hälfte	0,17	1,26	0,17	1,17	3,24
	untere „	0,17	1,14	0,18	1,13	3,20
5	obere „	0,15	1,24	0,22	1,09	3,26
	untere „	0,15	1,16	0,33	1,01	3,26

In den Versuchen an erkrankten Tieren ist die Steigerung des Zerfalls N-haltiger Stoffe eine außerordentlich hohe und auch hier ebenso wie bei den oben erwähnten Ruheversuchen an kranken Tieren durch einen großen Verlust an Eiweiß gekennzeichnet. In den an normalen Tieren durchgeführten Experimenten ist der relative Anteil der einzelnen Fraktionen am Gesamtumsatz ungefähr von der gleichen Größenordnung wie im Ruhestoffwechsel. Genaueren Aufschluß hierüber geben die beiden folgenden Versuche der Tabelle IV, in denen der N-Umsatz in der Ruhe und bei Reizung an den beiden Hälften *desselben* quer geteilten ZNS in je achtstündigen Perioden (im Juli bei 26,0 bis 28,8⁰) untersucht wurde.

Tabelle IV.

Vergleich des N-Umsatzes bei Ruhe und Reizung in Milligrammen pro 1 g und 8 Stunden und in Prozenten des Gesamt-N-Umsatzes.

Nr.	Versuchs-bedingungen	NH_3-N		NH_2-N		Eiweiß-N		Lipoid-N		Total-N
		mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg
1	Ruhe	0,20	6,6	0,80	26,4	0,38	12,5	0,75	24,8	3,03
	Reizung	0,22	3,4	2,32	37,5	0,44	7,1	1,03	16,7	6,20
2	Ruhe	0,15	6,0	0,70	28,9	0,34	14,0	0,72	29,2	2,42
	Reizung	0,16	2,7	2,07	35,1	0,36	6,1	1,07	18,2	5,89

Die beiden Versuche zeigen, daß bei einer Steigerung des Gesamtumsatzes auf das 2- bis 2½fache die absolute Menge des ausgeschiedenen NH_3, entsprechend unseren früheren Beobachtungen (a. a. O.), durch die Reizung *keine* Steigerung erfährt, der Prozentanteil am Gesamtumsatz daher auf die Hälfte absinkt. Ähnliches gilt auch für die Abgabe von Eiweiß, die gleichfalls durch die Reizung nicht merklich beeinflußt wird. Die Steigerung des Umsatzes ist also teils durch eine erhöhte Abgabe von Lipoid-N, vor allem aber von formoltitrierbarem N und N unbekannten Ursprungs bedingt. Die durch die Reizung bewirkten Veränderungen der einzelnen N-Fraktionen werden am übersichtlichsten, wenn man den Reizstoffwechsel in Prozenten des Ruheumsatzes ausdrückt, wie dies für die beiden obigen Versuche in der folgenden Tabelle V geschehen ist. Die Menge des N unbekannter Herkunft ist aus der Differenz zwischen direkt bestimmtem Total-N und der Summe der einzelnen N-Fraktionen berechnet; sie beträgt in Versuch 1 29,7 bzw. 36,3 Proz., in Versuch 2 21,1 bzw. 37,9 Proz.

Tabelle V.

Reizumsatz der Versuche aus Tabelle IV in Prozenten des Ruheumsatzes.

Nr.	NH_3-N	NH_2-N	Eiweiß-N	Lipoid-N	N unbekannter Herkunft	Total-N
1	110	290	116	137	253	205
2	107	296	106	149	437	244

C. Stoffwechsel bei Zuckerzufuhr.

In früheren Untersuchungen[1]) hatten wir gefunden, daß der Zusatz von Traubenzucker zu der Versuchslösung eine bedeutende N-Ersparnis bedingt, besonders im Reizstoffwechsel. Die Verringerung des Umsatzes N-haltiger Substanzen konnte hier 80 Proz. betragen und so groß sein, daß offenbar der gesamte Erregungsumsatz durch den zugesetzten Traubenzucker bestritten wurde; denn der *Reizumsatz* eines in *Zuckerlösung* befindlichen Präparats war nicht größer als der *Ruheumsatz* eines in gewöhnlicher *NaCl-Lösung* aufbewahrten Rückenmarks. Die folgenden Versuche hatten die Nachprüfung dieses Verhaltens für die einzelnen Fraktionen des N-Umsatzes zur Aufgabe. Dieser wurde stets vergleichend in 0,7proz. NaCl-Lösung und in solcher mit Zusatz von 0,5 Proz. Glucose an den beiden Hälften desselben quer geteilten ZNS in achtstündigen Versuchsperioden bestimmt. Die absoluten Werte sind in Tabelle VI wiedergegeben.

Tabelle VI.

Einfluß der Zufuhr von Traubenzucker auf den N-Umsatz in Milligrammen pro 1 g und 8 Stunden.

Nr.	Versuchslösung	Versuchsbedingung	t^0	NH_3-N	NH_2-N	Eiweiß-N	Lipoid-N	Total-N
1	Na Cl-Lösg.	Ruhe	24,1—24,6	0,17	0,65	0,17	0,63	2,51
	+ Zucker	"	24,1—24,6	0,27	0,68	0,23	0,70	1,67
2	Na Cl-Lösg.	Reizung	22,7—24,5	0,17	1,89	0,28	0,89	4,26
	+ Zucker	"	22,7—24,5	0,28	0,92	0,23	0,97	2,12
3	Na Cl-Lösg.	"	25,0—27,0	0,18	2,25	0,19	1,12	4,94
	+ Zucker	"	25,0—27,0	0,26	1,06	0,33	1,20	2,65
4	Na Cl-Lösg.	Ruhe	26,7—28,5	0,18	0,85	0,43	0,84	3,06
	+ Zucker	Reizung	26,7—28,5	0,28	1,06	0,41	1,22	3,06
5	Na Cl-Lösg.	Ruhe	24,5	0,19	0,71	0,29	0,87	2,63
	+ Zucker	Reizung	24,5	0,22	0,91	0,42	1,14	2,78

Betrachten wir die in dieser Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnisse, so können wir daraus die folgenden Schlußfolgerungen ableiten: Hinsichtlich des Gesamtumsatzes an N-haltigen Substanzen stimmen die Resultate mit unseren älteren oben zitierten völlig überein. Der Zusatz von Traubenzucker zu der NaCl-Lösung, in der das ZNS des Frosches überlebend erhalten wird, bewirkt eine gewaltige Verminderung der N-Abgabe, die in dem Ruheversuch 33,5 Proz., in den Reizversuchen 46 bis 50 Proz. des Umsatzes ohne Zucker beträgt. Ebenso wie früher wurde auch diesmal beobachtet, daß der *Erregungsumsatz* (das ist die durch die Reizung bewirkte Steigerung des Umsatzes

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **108**, 9, 1919.

über den Ruhewert) zur Gänze auf Kosten des zugesetzten Zuckers erfolgen kann, denn in den Versuchen 4 und 5 ist der Reizstoffwechsel bei Zuckerzufuhr nicht größer als der Ruhestoffwechsel ohne Zucker.

Die sparende Wirkung, die der Zucker in den einzelnen Fraktionen des N-Umsatzes bewirkt, ist aber eine höchst ungleiche. Wie schon in den früheren Untersuchungen über die NH_3-Bildung im ZNS beobachtet (a. a. O., S. 146), aber nicht weiter protokollarisch belegt wurde, hat die *Zuckerzufuhr* auf die *NH_3-Abgabe* durchaus keinen vermindernden Einfluß, ja es wird vielmehr sogar eine *Steigerung* derselben bewirkt. Das gleiche scheint, wenn auch in geringerem Umfange, beim Lipoid-N der Fall zu sein. Die — wohl von mehr zufälligen Faktoren abhängige — Größe der Eiweißabgabe zeigte keine bestimmt gerichtete Beeinflussung durch Zuckerzufuhr. So bleiben für die N-Ersparnis bloß der formoltitrierbare Stickstoff und die noch unbekannte N-Quelle übrig, deren Größe sich aus der Differenz zwischen dem direkt bestimmten Total-N und der Summe der einzelnen N-Fraktionen auch in diesen Versuchen (ohne Zuckerzufuhr) zu rund einem Viertel des Gesamtumsatzes berechnet. In dem Ruheversuch ist auch die Menge des NH_2-N bei Zuckerzufuhr unverändert; in den Reizversuchen dagegen ist tatsächlich eine bedeutende Ersparnis zu verzeichnen, die etwa 50 Proz. des Umsatzes an NH_2-N ohne Zuckerzufuhr beträgt. Der Rest der Ersparnis entfällt auf den *Stickstoff unbestimmter Herkunft* (Cerebroside ?), für den sich das sehr bemerkenswerte Resultat ergibt, daß er *durch die Zuckerzufuhr vollständig eingespart wird*, so daß der N-Umsatz im letzteren Falle zur Gänze aufgeklärt erscheint. Eine Übersicht über diese Befunde gibt die Tabelle VII, in welcher der in den Versuchen 1 bis 3 der Tabelle VI beobachtete Umsatz N-haltiger Substanzen bei Zuckerzufuhr in Prozenten des Umsatzes ohne Zucker ausgedrückt ist. Der N unbekannter Herkunft ist als X-N bezeichnet.

Tabelle VII.

N-Umsatz bei Zuckerzufuhr in Prozenten des Umsatzes ohne Zucker (Versuche 1 bis 3 der Tabelle VI).

Nr.	Versuchs-bedingung	NH_3-N	NH_2-N	Eiweiß-N	Lipoid-N	X-N	Total-N
1	Ruhe	159	105	135	111	0	67
2	Reizung	165	49	82	109	0	50
3	„	144	48	174	108	0	54

D. Einfluß der Narkose.

Je zwei Versuche mit 1 Proz. Äthylurethan und 6 Vol.-Proz. Äthylalkohol ergaben eine Herabdrückung des N-Umsatzes in achtstündigen Versuchsperioden bis unter die Grenze der Nachweisbarkeit.

Zusammenfassung.

Die mikroanalytische Untersuchung der von dem überlebenden isolierten Zentralnervensystem des Frosches an die umgebende Lösung abgegebenen N-haltigen Substanzen ergab, daß diese im *Ruhestoffwechsel* zu geringem Prozentsatz aus *Ammoniak* und *Eiweiß*, in der Hauptsache (im Mittel je 28 bis 29 Proz.) aus *mit Formol titrierbarem Stickstoff* und aus *Stickstoff wasserlöslicher Lipoide*, und zu etwa einem Viertel aus Stickstoff unbekannter Herkunft bestehen.

Im *Reizstoffwechsel* bleibt die absolute Menge des NH_3-N und des Eiweiß-N unverändert, die Menge des Lipoid-N steigt etwas, die des formoltitrierbaren N und des N unbestimmter Herkunft auf das Mehrfache an.

Die *Zufuhr von Traubenzucker* bewirkt, wie schon früher gefunden, eine gewaltige Einschränkung der N-Abgabe, besonders im Reizstoffwechsel, wo der ganze Erregungsumsatz durch den Zucker bestritten werden kann. Hierbei zeigt die Menge des Eiweiß-N keine bestimmt gerichtete Beeinflussung, die des Lipoid-N scheint ein wenig, die des NH_3-N sogar deutlich zuzunehmen, so daß die ganze N-Ersparnis auf Rechnung des formoltitrierbaren N und des N unbekannter Herkunft (Cerebroside ?) entfällt. Der Umsatz des letzteren kommt gänzlich in Fortfall.

Erkrankte Tiere zeigten eine stark erhöhte Eiweißabgabe und einen sehr gesteigerten Reizstoffwechsel. — Durch Narkose konnte der N-Umsatz unter die Grenzen der Nachweisbarkeit vermindert werden.

Eine Methode zur Bestimmung der labilen Serumglobuline.

Von

G. Leendertz.

(Aus der medizinischen Klinik in Königsberg i. Pr.)

(Eingegangen am 15. November 1925.)

In nachstehenden Ausführungen soll eine für manche klinische Fragen wichtige Untersuchungsmethode erörtert werden, die *die messende Erfassung der labilsten Serumglobuline* zum Gegenstand hat. Die klinische Brauchbarkeit der Methode hat sich mir in einer größeren Zahl von Einzeluntersuchungen erwiesen. Über die klinische Auswertung der so gewonnenen Resultate soll demnächst an anderer Stelle berichtet werden. Hier möchte ich vor allem der Verpflichtung nachkommen, auf die wissenschaftliche Begründung des Prinzips der Methode, die Abgrenzung ihrer Brauchbarkeit, die möglichen Fehlerquellen, inneren Kontrollen usw. einzugehen.

I. Zweck der Methode.

Serologische Untersuchungen früherer Autoren hatten gezeigt, daß die Labilität eines Serums parallel geht mit dem quantitativen Verhältnis der grobdispersen zu den feindispersen Eiweißkörpern in dem Sinne, daß bei einer „Verschiebung zur grobdispersen Seite hin" die Serumlabilität erhöht gefunden wird. Wenn auch der Nachweis nicht erbracht ist, daß grobdisperse Proteine schon lediglich auf Grund ihres Dispersitätsgrades leichter ausflockbar sind, so ist doch jener Parallelismus so konstant, daß man in praxi den relativen Gehalt eines Serums an grobdispersen Proteinen als Maßstab seiner Labilität benutzen kann.

Es handelte sich demnach darum, eine für klinische Zwecke brauchbare, also nicht zu komplizierte und zeitraubende Methode zur Bestimmung einer *möglichst eng umschriebenen Fraktion grobdisperser Proteine* zu finden. Denn dies schien der einzig gangbare Weg zu sein, um für die Serumlabilität einen *objektiven* Maßstab zu gewinnen. Die bisherigen Labilitätsreaktionen haben nämlich entweder den Nachteil, daß der Grad der Flockung nur *geschätzt* wird, oder daß die Resultate,

wie z. B. die der Senkungsreaktion der roten Blutkörperchen, also einer *biologischen* Reaktion, zu vieldeutig und nicht *allein* von den Proteinverhältnissen abhängig sind. Die gesuchte Methode mußte also zu objektiven, d. h. *zahlenmäßig ausdrückbaren Werten* führen, die auch von verschiedenen Untersuchern in genau gleicher Weise zu erhalten sind. Auch mußte sie *empfindlich genug* sein, um schon geringe Schwankungen der Proteinverteilung im Serum anzuzeigen.

II. Welche Proteinfraktion ist dazu geeignet?

Es mußte von der Methode gefordert werden, daß sie einen durch einen einfachen Eingriff jederzeit qualitativ und quantitativ genau reproduzierbaren Anteil der grobdispersen Proteine meßbar zur Darstellung bringt.

Die Am_2SO_4-Halbsättigungsfraktion kam von vornherein nicht in Betracht, weil sie einen zu großen Proteinanteil, nämlich die gesamten Serumglobuline umfaßt. Dies erschien deshalb weniger erstrebenswert, weil eine „Verschiebung der Proteine zur grobdispersen Seite hin" sich weniger in einer Vermehrung der Gesamtglobuline (im prozentualen Verhältnis zu den gesamten Serumproteinen) ausdrücken wird, als in einer Mengenzunahme gerade der gröbstdispersen Teilchen, die vermutlich in relativ stärkerem Maße vermehrt sind.

Derselbe Grund sprach mit gegen die Verwendung des *Rohrer*schen Verfahrens (refraktometrisch-viskosimetrische Bestimmung des Globulin-Albuminverhältnisses), ganz abgesehen von dessen beträchtlicher Ungenauigkeit.

In erster Linie kam daher *die Bestimmung des unlöslichen (lyophoben) Globulins* in Frage. Dieses gewinnt man bekanntlich nach *Hammarsten*[1]) durch Verdünnung des Serums mit der 10- bis 15fachen Menge Wasser und Durchleiten gasförmiger CO_2. Statt der CO_2-Fällung kann man vor Verdünnen auch mit verdünnter Essigsäure schwach ansäuern. Das so erhaltene Globulin ist nicht frei von Fibrinogen und Fibrinoglobulin, auch läßt sich so nicht die Gesamtmenge des Serumglobulins gewinnen. Trotzdem glaubte *Brailsford Robertson*[2]) auf diese Art (mit seiner weiter unten erwähnten Methode) das gesamte Euglobulin des Serums zu bestimmen. Für unsere Zwecke ist es nun keineswegs von Belang, ob der ausgefällte Niederschlag die Reindarstellung einer chemisch wohlcharakterisierten Proteinfraktion bedeutet oder nicht. Die Fibrinogen- und Fibrinoglobulinbeimischung erscheint eher vorteilhaft, da es ja darauf ankommt, möglichst grobdisperse Teilchen zu

[1]) *Hammarsten*, Pflügers Arch. 17 und 18, 1878.

[2]) *Brailsford Robertson*, Journ. of biol. Chem. 28, 1912 (zitiert nach *Reiss* in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethod.).

erfassen. Daß der Niederschlag nicht das ganze Euglobulin umfaßt, dürfte auch für uns nur erwünscht sein, da wir ja auf eine möglichst *eng begrenzte* grobdisperse Fraktion Wert legen.

III. Versuche mit CO_2-Globulin.

So wurde, zunächst noch in Unkenntnis des Verfahrens von *Robertson,* ein refraktometrisches Differenzverfahren ausgearbeitet, das auf der Globulinfällung nach *Hammarsten* beruht. Serum wurde mit der zehnfachen Menge Wasser verdünnt und daraus durch Durchleiten von CO_2 ein *Niederschlag von Globulinen* ausgefällt und abzentrifugiert. Die refraktometrische Bestimmung der Lichtbrechung des verdünnten Serums vor und nach CO_2-Fällung ergab infolge der starken Verdünnung so geringe Differenzen, daß etwaige Ablesefehler sich bei der Berechnung in so hohem Maße auswirken mußten, daß dadurch kein genügender Genauigkeitsgrad erreichbar war.

Es mußte also die quantitative Bestimmung des Niederschlages selbst in Angriff genommen werden. Gravimetrische Methoden mußten der Umständlichkeit halber als für eine klinische Methode unbrauchbar von vornherein ausscheiden. Der Niederschlag war in Alkali und, wie sich zeigte, *im ursprünglichen Serum wieder löslich.* Es wurde daher der Niederschlag in Aqua destillata gewaschen und wieder abzentrifugiert, was eventuell nochmals wiederholt wurde. Dann wurde er im Exsikkator getrocknet und in 1 ccm des ursprünglichen Serums gelöst. Die Differenz der Lichtbrechung dieses Serums und desjenigen ohne den darin gelösten Niederschlag entsprach dem Gehalt des Serums an *CO_2-Globulin.* Um den Wert in Prozenten auszudrücken, müßte man die spezifische Refraktion dieses Globulins kennen. Bei der Durchsicht der Literatur auf Angaben der spezifischen Refraktion von Eiweißkörpern fand ich die Methode von *Brailsford Robertson,* die fast auf dem gleichen Prinzip beruht. Dieser Autor hält den durch Serumverdünnung und CO_2-Fällung erhaltenen Niederschlag für das *Euglobulin* des Serums und gibt dafür die spezifische Refraktion $n_D = 0{,}00229$ an. Seine Methode dürfte aber für klinische Zwecke zu umständlich sein, erfordert auch jedesmal mindestens 10 ccm Serum. Daß der Niederschlag nicht das ganze Euglobulin umfaßt und auch nicht aus reinem Euglobulin besteht (Fibrinogenreste und Fibrinoglobulin sind mit darin enthalten), ist für unsere Zwecke zumindest kein Nachteil. Es zeigten sich jedoch bald praktische Schwierigkeiten in der bisherigen Ausführung der Untersuchung. Erstens ist die CO_2-Fällung insofern wenig geeignet, als sich bei noch so langsamer Gasblasenfolge eine Schaumbildung nicht vermeiden läßt, und dadurch die Möglichkeit besteht, daß Teile des Niederschlages verloren gehen. Zudem ist die CO_2-Fällung etwas umständlich. Zweitens scheint das

Globulin durch Waschen und Austrocknen an Löslichkeit einzubüßen, denn es gelang stellenweise nicht mehr, diese zu erzielen.

Dem ersten Übelstand wurde dadurch abgeholfen, daß auf die CO_2-Fällung überhaupt verzichtet und diese durch ***Essigsäurefällung*** ersetzt wurde. Es erwies sich als zweckmäßig, dem Serum die zehnfache Menge oder mehr einer ***0,25 prom. Essigsäure*** zuzusetzen. Zweitens wurde auf das Waschen und Trocknen des Niederschlages ebenfalls verzichtet. Dieser blieb vielmehr mit einem kleinen Rest des verdünnten Serums nach dem Zentrifugieren im Zentrifugenglas. Dazu wurde das doppelte Volumen Serum zugesetzt, worin sich der Niederschlag stets restlos löste. Die Lichtbrechung dieser Lösung und diejenige einer Mischung von 1 Teil Serumverdünnung, aus der die Globuline ausgefällt und abzentrifugiert waren, mit 2 Teilen Serum wurden mit dem *Pulfrich*schen Refraktometer bestimmt. Ihre Differenz entspricht unter Berücksichtigung der Verdünnung und der spezifischen Refraktion (gleich dem Brechungsvermögen einer 1 proz. Lösung) dem Brechungsanteil der in 1 Teil Serum enthaltenen „***Essigsäureglobuline***“.

IV. Methodik.

Die Untersuchung gestaltete sich nunmehr folgendermaßen:

Benutzt wurden stets etwas über 3 ccm Serum. Es steht nichts im Wege, auch mit geringeren Mengen, etwa der Hälfte, zu arbeiten. Da jedoch Venenpunktion erforderlich ist, wurde immer — möglichst vom nüchternen Kranken — etwa drei Viertel Reagenzglas voll Blut entnommen, ein Quantum, das man wohl jedem Patienten, auch bei wiederholter Untersuchung, zumuten kann. Das Serum wurde stets bald nach der Blutentnahme untersucht; man kann es aber ebensogut bei kühler Temperatur aufbewahren.

Zweckmäßigerweise beginnt man mit der Bestimmung des Brechungsindex des Serums mittels des *Pulfrich*schen Refraktometers, dessen Hilfsprisma mit einem Tropfen Serum beschickt wird. Während das Instrument im Temperierbad steht — 10 Minuten sind dazu erforderlich —, geht die Untersuchung weiter. Man gibt in ein starkwandiges, unten spitz zulaufendes, mit einem Teilstrich für 0,5 ccm versehenes Zentrifugenglas[1]) genau 1,0 ccm Serum und dazu 10 ccm einer 0,25 prom. Essigsäurelösung (die wegen schlechter Haltbarkeit am besten jedesmal frisch aus einer 2,5 proz. Stammlösung durch Verdünnung 1 : 100 herzustellen ist). Sofort tritt eine Flockung der labilsten Globuline auf. Sodann wird 10 Minuten mit etwa 3000 bis 3500 Umdrehungen zentrifugiert. Währenddessen kann man den Brechungswert (R_s) des Serums in Pulfricheinheiten ablesen. Nach beendetem Zentrifugieren wird die über dem in der Spitze des Zentrifugenglases befindlichen, weißen Niederschlag stehende, ganz klare Flüssigkeit bis genau zum Teilstrich 0,5 vorsichtig abgesaugt und in ein Reagenzglas gegeben. Zum Absaugen bedient man sich zweckmäßigerweise zunächst

[1]) Wohl durch jeden Glasbläser kann man sich einige derartige Gläser anfertigen lassen; genaue Eichung ist jedoch erforderlich.

einer Pipette von etwa 10 ccm, die mit einem Glashahn und einem Schlauch versehen ist. Mit dieser saugt man, ohne mit der Pipettenspitze die Innenwand des Zentrifugenglases zu berühren, welcher in der Spitze gelegentlich Spuren des Niederschlages anhaften, bis etwas oberhalb des Teilstriches langsam ab und schließt den Hahn. Auf diese Art läßt sich ein Rückströmen der Flüssigkeit und Aufrühren des Niederschlages leicht vermeiden. Für das weitere Absaugen bis genau zum Teilstrich nimmt man am besten eine zur Kapillare ausgezogene, ebenfalls mit Schlauch armierte Pipette. Zentrifugenglas und Hahnpipette kann man zur Erleichterung des Arbeitens an einem der in chemischen Laboratorien üblichen Metallständer befestigen. Diese kleinen Kunstgriffe sind erwähnenswert, weil bei nicht sorgfältigem Absaugen leicht Fehler entstehen können, die sich aber bei vorsichtigem Arbeiten und einiger Übung völlig vermeiden lassen. Zu dem Globulinsediment mit der bis zum Teilstrich darüberstehenden Flüssigkeit gibt man nun wieder genau 1,0 ccm Serum, in welchem sich der Niederschlag vollständig lösen läßt. Man befördert dessen Lösung (Peptisation), indem man mit einem in der Flamme fein ausgezogenen Glasstäbchen umrührt, wobei auch darauf zu achten ist, daß etwa der Innenwand der Zentrifugenglasspitze anhaftende Globulinteilchen mitgelöst werden. Von der so entstandenen, klaren Lösung bringt man einen Tropfen auf das Refraktometerprisma und bestimmt den Brechungswert R_1. Währenddessen mischt man in einem kleinen Reagenzglas genau 1 ccm Serum mit 0,5 ccm der vom Globulinniederschlag abgesaugten Flüssigkeit. Schließlich wird auch der Brechungswert dieser Mischung bestimmt (R_2). (Dauer der ganzen Untersuchung etwa 40 Minuten.)

V. Berechnung.

Der Brechungswert R_1 bezieht sich also auf 1,5 ccm einer Lösung, die 1 ccm Serum und 0,5 ccm „Restflüssigkeit" mit den aus 1 ccm Serum ausgefällten Essigsäureglobulinen oder „*Labilglobulinen*", wie ich sie nannte, enthält. Der Wert R_2 entspricht einer Mischung von 1,0 ccm Serum mit 0,5 ccm Restflüssigkeit. Die Differenz $R_1 - R_2$ zeigt das Brechungsvermögen der aus 1 ccm Serum ausgefällten Labilglobuline in 1,5 ccm Lösung, muß also, um auf das ursprüngliche Volumen von 1 ccm bezogen zu werden, noch mit dem Verdünnungsfaktor 1,5 multipliziert werden. Streng genommen ist dieses Vorgehen falsch, man müßte eigentlich statt der R-Werte (Skalenteile) die *Brechungsindizes* einsetzen und die *spezifische Refraktion* in die Berechnung einbeziehen. Will man den Gehalt des Serums in Prozenten ausdrücken, oder sollen die Labilglobuline in Prozenten des Gesamtproteins angegeben werden, so ist diese Art der Berechnung überhaupt die einzig zulässige. Da es zu dem vorliegenden Zwecke aber nicht auf eine quantitative Analyse ankam, es sich vielmehr nur darum handelte, einen zahlenmäßig ausdrückbaren Anhalt für die Menge der Labilglobuline im Serum zu gewinnen, wurde der Einfachheit halber die Einsetzung der R-Werte statt der Indizes in die Rechnung gewählt.

Auch das Verhältnis der Labilglobuline zu den gesamten Serumproteinen (Q) wurde zahlenmäßig einfach nach der Formel

$$Q = \frac{(R_1 - R_2) \cdot 1{,}5 \cdot 100}{R_s} \quad \left[\text{„}\frac{\text{Labilglobulin}}{\text{Serumprotein}}\text{quotient“}\right]$$

ausgedrückt, was mathematisch-physikalisch ebenso falsch ist, da die Intervalle zwischen zwei Skalenteilen in verschiedener Höhe der Skala nicht ganz gleichen Brechungswerten entsprechen und die spezifische Refraktion der Eiweißkörper überhaupt unberücksichtigt bleibt. Da aber gegen die refraktometrische Eiweißbestimmung überhaupt Einwände zu erheben sind, und da meine Methode nicht den Anspruch auf eine genaue quantitative Proteinbestimmung machen soll, wurde auch alles vermieden, was diesen Anschein erwecken könnte, und absichtlich dieser willkürliche Maßstab gewählt. *Immerhin ist dieser durch den Quotienten Q ausgedrückte Maßstab fein genug, um alle Verschiebungen im Verhältnis der Labilglobuline zu den gesamten Serumproteinen nicht nur ihrer Richtung, sondern auch ihrem Ausmaß nach richtig anzuzeigen.*

VI. Kritik der Methode.

Erfüllt die Methode nun wirklich den Zweck, jeweils eine bestimmte Eiweißfraktion, im Falle der Vermehrung der grobdispersen Proteinteilchen also eine größere Quantität auszufällen, oder ist etwa die *Menge des ausgefällten Niederschlages von anderen Faktoren abhängig*? Wird sie beeinflußt etwa von dem Grade der Verdünnung des Serums mit Wasser, dem Gehalt an Essigsäure, der Dauer der Einwirkung der verdünnten Essigsäure, der Dauer des Zentrifugierens? Ist auch der Zeitpunkt der Verarbeitung des Serums von Belang? Schließlich mußte der Ausfall von Parallelbestimmungen geprüft, die möglichen Fehlerquellen berücksichtigt und daraus die gesamte Fehlerbreite der Methode festgelegt werden. Alle diese Fragen waren zu prüfen, ehe ein klinisches Arbeiten mit der Methode berechtigt war.

A. Ist die Menge des Niederschlages abhängig

1. von dem Verdünnungsgrad und dem Gehalt der Verdünnungsflüssigkeit an CH_3COOH?

Versuchsreihe 1[1]). Serum vom Lichtbrechungsvermögen $R_s = 59{,}7$; je 1 ccm wird versetzt mit

a) 10 ccm einer 0,25prom. Essigsäurelösung
b) 15 ,, ,, 0,25 ,, ,,
c) 2 ,, Aqua dest. + 8 ccm 0,25prom. Essigsäurelösung
d) 5 ,, ,, ,, + 10 ,, 0,25 ,, ,,

[1]) Die allen Versuchsreihen zugrunde liegenden Untersuchungen wurden mehrfach angestellt, hier ist nur je ein Beispiel angeführt.

Die Proben a) bis d) wurden in der üblichen Weise verarbeitet. Die Brechungswerte für R_1 und R_2 variierten ganz unbedeutend, entsprechend dem verschiedenen Gehalt an Wasser und Essigsäure. *Die Differenz $R_1 - R_2$ ergab jedoch in allen Proben den gleichen Wert* ($R_1 - R_2 = 1{,}6$).

Somit ist erwiesen, daß die Menge der ausgefällten Globuline in der Tat von diesen Faktoren unabhängig ist.

2. von der *Dauer* der Essigsäureeinwirkung auf das Serum?

Versuchsreihe 2. Serum vom Lichtbrechungsvermögen $R_s = 60{,}3$; je 1 ccm Serum wird mit 10 ccm 0,25proz. Essigsäure versetzt, die erste Probe wird sofort zentrifugiert und verarbeitet, die zweite nach vierstündigem Stehen. Die Brechungswerte beider Proben waren genau gleich (49,1).

Hierdurch ist erwiesen, daß die vollständige Ausfällung der Labilglobuline sofort erfolgt, die Dauer der Essigsäureeinwirkung also irrelevant ist.

3. von der Dauer des Zentrifugierens?

Versuchsreihe 3. Zwei weitere Proben der vorigen Versuchsreihe wurden je 10 Minuten und 1 Stunde bei etwa 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Die Brechungswerte beider Proben R_1 waren gleich (49,1).

Es ergibt sich hieraus, daß 10 Minuten dauerndes Zentrifugieren genügt, um alle ausgeflockten Globulinteilchen zu Boden zu reißen.

4. von dem Zeitpunkt der Verarbeitung des Serums?

Versuchsreihe 4. Blutentnahme am 9. September 1923, 11 Uhr vormittags.

Probe a), frisch untersucht: $R_s = 61{,}2$; $R_1 = 49{,}1$; $R_2 = 47{,}7$; $R_1 - R_2 = 1{,}4$; $Q = 3{,}4$.

Probe b), nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur: $R_s = 62{,}7$; $R_1 = 49{,}7$; $R_2 = 48{,}8$; $R_1 - R_2 = 0{,}9$; $Q = 2{,}2$.

Probe c), nach 48stündiger Aufbewahrung im Eisschrank: $R_s = 62{,}8$; $R_1 = 49{,}8$; $R_2 = 48{,}4$; $R_1 - R_2 = 1{,}4$; $Q = 3{,}3$.

Diese Versuchsreihe zeigt, daß längeres Aufbewahren im Eisschrank das Resultat kaum beeinflußt, wenn auch der Gesamtbrechungswert (wie bekannt) eine Änderung erlitt, in diesem Falle von 61,2 auf 62,8 anstieg. Dagegen verändert sich beim Stehen des Serums bei wärmerer Temperatur sowohl das Gesamtbrechungsvermögen als auch der Labilglobulinwert, hier im Sinne einer Verminderung. Man muß hier wohl eine Strukturänderung annehmen. Es ergibt sich hieraus die Forderung, das *Serum möglichst frisch zu verarbeiten*, oder, wo dies nicht angängig, es wenigstens im Eisschrank aufzubewahren.

B. Parallelbestimmungen. Fehlerquellen und -breite der Methode.

Bei den meisten der klinischen Arbeit zugrunde liegenden insgesamt 88 Untersuchungen wurden Doppelbestimmungen gemacht, die größtenteils völlig übereinstimmende Werte für R_1 und R_2 ergaben. Gelegentlich kamen Abweichungen im Maße von $\pm 0{,}05$ Teilstrich vor. Fehler können entstehen durch ungenaues Pipettieren und Absaugen der überstehenden Flüssigkeit vom Niederschlag. Bei einiger Übung lassen sie sich aber vermeiden. Eine weitere Fehlerquelle liegt im Ablesen der Brechungswerte. Nach meinen Erfahrungen wie auch Angaben der Literatur ist der Ablesefehler nicht größer als $\pm 0{,}05$ Teil-

strich. Daraus läßt sich die Fehlerbreite der Methode für Q auf $\pm 0{,}25$ berechnen. Die beiden möglichen Extreme, nämlich gleichzeitige Abweichungen von 0,05 Teilstrich für R_1 nach oben, für R_2 nach unten und für R_3 nach oben einerseits und für R_1 nach unten, R_2 nach oben und R_3 nach unten andererseits ergeben für Q die höchstmögliche Abweichung von 0,5. Dieser Fall ist, wie gesagt, das Extrem der durch Ablesefehler möglichen Fehlerbreite und wird vermutlich nur selten vorkommen.

Zusammenfassung.

Im Bestreben, eine möglichst eng umschriebene Fraktion grobdisperser Serumproteine zu erfassen, wurde nach Versuchen mit Kohlensäureglobulin eine Methode zur Bestimmung der Essigsäureglobuline ausgearbeitet. Der „$\frac{\text{Labilglobulin}}{\text{Serumprotein}}$quotient“ drückt das (ungefähre) prozentuale Verhältnis der durch Essigsäure fällbaren Globuline zu den Gesamtproteinen des Serums aus. Es wird durch Versuche dargetan, daß die mit der Methode erhaltenen Werte tatsächlich nur vom Gehalt des Serums an den genannten Globulinen abhängig sind. Der Genauigkeitsgrad von Doppelbestimmungen und die Fehlerbreite der Methode werden erörtert.

Verfütterung von Nitroanthrachinon.

Von

Hanns John und **Viktor Fischl.**

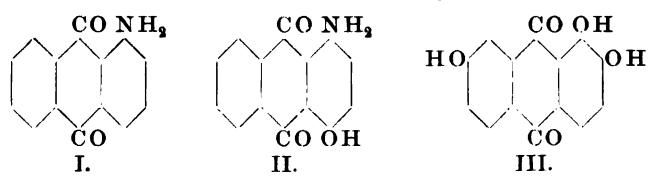
(Aus dem Hygienischen Institut der Deutschen Universität, Prag.)

(Eingegangen am 15. November 1925.)

In dieser Zeitschrift[1]) wurde mitgeteilt, daß nach Verfütterung von Nitroanthrachinon an Mäuse in deren Harn Aminoanthrachinon und gleichfalls rot gefärbte, aber alkalilösliche Anthrachinonderivate gefunden werden. Diese Beobachtung und der Umstand, daß die Menge der bei diesen Versuchen erhaltenen, eben genannten Verbindungen sehr gering war und deshalb für eine genaue Bestimmung nicht ausreichte, gab auch aus den früher erörterten Gründen Veranlassung, diese Experimente mit größeren Tieren zu wiederholen.

Die hierbei erlangten Ergebnisse lassen sich dahin zusammenfassen:

Verfüttert man reines l-Nitroanthrachinon an Meerschweinchen, erhält man etwa 9 Proz. davon in Form von anderen Anthrachinonderivaten im Harn der Tiere wieder. Der Kot ist frei von solchen und zeigt normale Beschaffenheit. 20,0 g Nitroanthrachinon ergaben: 0,87 g 1-Amino-anthrachinon (I), 0,38 g 1-Amino-4-oxy-anthrachinon (II), 0,35 g 1, 2, 7-Trioxy-anthrachinon (III) und 0,03 g eines nicht identifizierten, über 320° schmelzenden Amino-oxy-anthrachinons.



Die Frage, in welcher Form diese drei Stoffe, von welchen gerade nur das 1, 2, 7-Trioxy-anthrachinon, und dieses sehr beschränkt, in Wasser löslich ist, im Harn gelöst waren, konnte bisher keiner endgültigen Beantwortung zugeführt werden. Ebenso bleibt es späteren

---

[1]) *Hanns John*, diese Zeitschr. **155**, 161, 1925.

Untersuchungen vorbehalten, über die Bildung der Substanzen im Organismus Näheres auszusagen und das Schicksal der restlichen Menge des verfütterten Nitroanthrachinons im Tierkörper aufzuklären.

Die Versuche wurden in nachfolgender Weise durchgeführt:

Drei männliche Meerschweinchen — Gesamtgewicht 1350 g —, die mit angefeuchtetem Hafer und Grünfutter ernährt wurden, bekamen mittels eines Löffels zu etwa 0,25 g pro Tier und dosi innerhalb von 9 Tagen 20,0 g bei 228° schmelzendes analysenreines 1-Nitroanthrachinon, welches noch zudem dahin geprüft wurde, daß es weder beim Kochen mit Wasser, noch mit verdünnter oder konzentrierter Lauge oder Salzsäure diese verfärbte. Bereits 1 Stunde nach Verabreichung der ersten Gabe von Nitroanthrachinon war der Harn der Tiere, welche durch die ganze Versuchsdauer normales äußeres Verhalten zeigten, purpurrot gefärbt, während der Kot, der gleichfalls quantitativ separat gesammelt wurde, innerhalb derselben Zeit immer unverändertes Aussehen und Farbe hatte. Das Gewicht der Tiere betrug am zehnten Tage seit Beginn der Verfütterung, zu welchem Zeitpunkt der Harn wieder ungefärbt war, 1060 g.

Harn.

Der tiefrot gefärbte Harn — Menge 216 ccm —, in welchem sich eine geringe Menge heller Flocken befand, wurde wie nachstehend beschrieben aufgearbeitet:

Der Harn wurde mit 25 ccm n/10 Salzsäure angesäuert und bei 60° zur Trockne gebracht. Es verblieb ein klebriger Rückstand — Gewicht 37,5 g —, welcher nach dreiwöchigem Trocknen über Schwefelsäure und Phosphorpentoxyd im Vakuumexsikkator 31,0 g eines dunkelroten, sehr hygroskopischen Pulvers ergab.

Eine Probe davon mit Zinkstaub und Natronlauge gekocht, zeigte intensive Rotfärbung[1]); eine geringe Menge, in Benzol gelöst, mit Ammoniak versetzt und geschüttelt, gab die *Bornträger*sche Reaktion[2]).

Das eben erwähnte Produkt wurde mit insgesamt 500 ccm thiophenfreiem, trockenem Benzol bis zur Farblosigkeit der abtropfenden Flüssigkeit im Heißextraktionsapparat behandelt, welche Operation 3 Wochen in Anspruch nahm und bei der schon nach kurzer Zeit die Abscheidung von dunkel gefärbten Krusten im Kolben beobachtet werden konnte.

Benzolextrakt.

Die nach Abdestillieren des Benzols verbleibende Substanz wurde, wie oben angegeben, bei Gegenwart von festem Paraffin im Vakuum getrocknet und bildete dann 2,7 g einer dunkelrot gefärbten, schwach riechenden Masse.

[1]) *Böttger*, J. pr. 2, 133, 1870; *Graebe* und *Liebermann*, A. 160, 127, 1871.

[2]) *Bornträger*, Z. anal. 1880, S. 165; *Tschirch*, Ber. d. D. Pharm. Ges. 8, 174, 1898.

Diese wurde portionsweise mit insgesamt 250 ccm n/20 Natronlauge, d. h. bis zur Farblosigkeit der Flüssigkeit, bei 60⁰ digeriert und der in Alkali nicht lösliche rotgefärbte Rückstand auf einem Filter gesammelt, neutral gewaschen und bei 110⁰ getrocknet. Die Menge desselben betrug dann 0,65 g.

Diese kristallinisch erscheinende Substanz wurde einer Vakuumsublimation unterworfen. Nach Wiederholung derselben resultierten hellrote Nadeln, deren Schmelzpunkt bei 246⁰ lag. Eine Probe davon, mit reinem 1-Amino-anthrachinon gemischt, zeigte den gleichen Schmelzpunkt. Bestimmung des Stickstoffs nach *Dumas* ergab:

0,1457 g Substanz: 8,6 ccm N (27⁰, 738 mm).
$C_{14}H_9O_2N$. Ber.: N 6,28 Proz.
Gef.: N 6,29 „

Das rotviolette alkalische Filtrat wurde in der Kälte mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure angesäuert. Es fielen dunkelrote Flocken aus, welche abgesaugt, chlorfrei gewaschen und bei 110⁰ getrocknet wurden. Gewicht 0,27 g. Zweimalige Sublimation im Vakuum ergab violettrote Nadeln, welche bei 207⁰ schmolzen. Der Mischschmelzpunkt mit 1-Amino-4-oxy-anthrachinon (B. A. S. F.) lag bei 206⁰. Eine Stickstoffbestimmung lieferte das nachstehende Ergebnis:

0,1196 g Substanz: 6,6 ccm N (27⁰, 738 mm).
$C_{14}H_9O_3N$. Ber.: N 5,86 Proz.
Gef.: N 5,88 „

Die nach Abfiltrieren des 1-Amino-4-oxy-anthrachinons zurückgebliebene salzsaure Flüssigkeit wurde dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Dieser hinterließ beim Abdampfen 1,45 g eines stark riechenden, rotbraunen Sirups, der sich leicht in Natronlauge löste. Aus dieser konnte nach Filtration durch Salzsäure ein hell gefärbtes Öl gefällt werden, welches nach längerem Stehen in einer Kältemischung kristallinisch erstarrte. Die Substanz schmolz dann bei 160⁰. Umkristallisation aus verdünntem Alkohol erhöhte den Schmelzpunkt auf 186⁰. Die Substanz wurde durch die bekannten hierfür charakteristischen Reaktionen als Hippursäure erkannt.

Die restierende wässerige Phase wurde zur Trockne gebracht. Der braun gefärbte Rückstand, dessen Menge nach Trocknen bei 110⁰ nunmehr 2,20 g betrug, war frei von Anthrachinonderivaten und bestand in der Hauptsache aus Natriumchlorid, welches mit einer Spur organischer Substanz verunreinigt war.

Extraktionsrückstand.

Die nach der Benzolextraktion in der Hülse verbliebene dunkelrote, klebrige, hygroskopische Masse wog 28,0 g.

Proben davon, wie früher beschrieben, qualitativ daraufhin untersucht, zeigten die Anwesenheit von Anthrachinonderivaten bzw. Oxyanthrachinonen. Dieses Produkt wurde portionsweise mit insgesamt 400 ccm Wasser auf dem Wasserbad bis zur Farblosigkeit der überstehenden Flüssigkeit digeriert und filtriert. Am Filter verblieb der Rückstand (A). Das rotgefärbte Filtrat wurde mit Kaliumchlorid bis zur Sättigung versetzt und mit einigen Tropfen n/10 Natronlauge schwach alkalisch gemacht (B). Der nach 24 Stunden ausgefallene flockige Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt, mit eiskaltem Wasser gewaschen und bei 110° getrocknet. Die Menge dieses roten kristallinischen Produktes betrug 0,62 g. Es wurde mit 150 ccm n/20 Natronlauge auf dem Wasserbad digeriert. Die hierbei erlangte, in Lauge unlösliche Substanz — Gewicht 0,55 g — erwies sich als anthrachinonfrei und bestand fast nur aus anorganischen Salzen.

Glührückstand. 0,5457 g Substanz: 0,5392 g = 98,8 Proz. Asche.

Das Filtrat lieferte beim Versetzen mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure in der Kälte einen braunroten Niederschlag, welcher auf einem Filter gesammelt, chlorfrei gewaschen und bei 110° getrocknet wurde. Menge 0,05 g. Diese Substanz war sublimierbar und wurde durch zweimalige Sublimation im Vakuum gereinigt. In diesem Zustande stellte sie gelbrote Nadeln dar. Sie enthielt keinen Stickstoff und war bei 320° noch nicht geschmolzen; sie löste sich in geringer Menge in Wasser und Äther, leicht in Alkohol und Chloroform, ebenso in Alkalien. Die violettrote Farbe der schwefelsauren Lösung schlug auf Zusatz von Salpetersäure in gelbbraun um. Diese Eigenschaften stimmen mit denen des 1, 2, 7-Trioxy-anthrachinons überein. Ein Gemisch der vorliegenden Substanz mit reinem 1, 2, 7-Trioxy-anthrachinon (B. A. S. F.) war bei 320° noch nicht geschmolzen.

Das schwach alkalische Filtrat von der durch Aussalzen mit Kaliumchlorid erzeugten Fällung (B) wurde mit Bariumchlorid versetzt. Es entstand unter Entfärbung der Flüssigkeit, die nunmehr frei von Anthrachinonderivaten war und — wie Abdampfen und Untersuchung der zurückbleibenden Masse ergab — in der Hauptsache nicht verbrennbare Verbindungen enthielt, ein Niederschlag, der — bei 110° getrocknet — 3,05 g wog und mit n/20 Natronlauge, wie früher angegeben, in der Wärme behandelt wurde. Aus dem Filtrat wurden in der schon beschriebenen Weise weitere 0,11 g 1-Amino-4-oxy-anthrachinon gewonnen. Der Rückstand am Filter bestand lediglich aus anorganischen Salzen.

Der Rückstand (A), der nach Auswaschen und Trocknen 2,75 g wog, wurde mit 150 ccm absoluten Alkohols extrahiert. In der Hülse verblieb ein blaß rotviolett gefärbtes kristallinisches Pulver — Menge 2,15 g —, welches mit n/20 Natronlauge behandelt wurde (C). Der

hierbei erhaltene Rückstand bestand aus anorganischen Salzen, vorwiegend Trimagnesiumphosphat und Calciumsulfat.

Glührückstand. 0,7631 g Substanz: 0,7578 g = 99,3 Proz. Asche.

Das alkalische Filtrat von (C) war rotviolett gefärbt und gab beim Ansäuern einen Niederschlag, der nach Waschen und Trocknen 0,03 g wog. Diese Substanz war stickstoffhaltig und schwefelfrei. Eine Probe davon gab mit Zinkstaub und Lauge Rotfärbung. Die *Bornträger*sche Reaktion war positiv. Sublimation im Vakuum lieferte ein in ıoten Nadeln kristallisiertes Produkt, das bei 320° noch nicht geschmolzen war. Zur näheren Identifizierung reichte die Menge der vorhandenen Substanz nicht aus.

Der alkoholische Extrakt lieferte nach dem Eindampfen 0,55 g Rückstand, aus welchem weitere 0,22 g 1-Aminoanthrachinon gewonnen werden konnten.

Das hierbei erlangte, tief violettrote alkalische Filtrat gab beim Ansäuern nochmals 0,30 g eines Produktes, das nach vorangegangener Reinigung durch Vakuumsublimation bei 320° noch nicht geschmolzen war. Auch der Mischschmelzpunkt mit reinem 1, 2, 7-Trioxyanthrachinon lag über 320°. Die Analyse lieferte folgende Werte:

0,1492 g Substanz: 0,3633 g CO_2 und 0,4168 g H_2O.

$C_{14}H_8O_5$.	Ber.:	C 65,6 Proz.	H 3,1 Proz.
	Gef.:	C 66,4 „	H 3,2 „

Kot.

Der Kot, welcher, wie eingangs bereits erwähnt, während des ganzen Versuchs normales Aussehen und Farbe hatte, wurde zunächst im Vakuum, später — gepulvert — bei 110° getrocknet. Er wog dann 57,0 g. Die Anthrachinonprobe und die *Bornträger*sche Reaktion waren negativ. Er enthielt keinen Blutfarbstoff, kein Hämatin, keine Porphyrine, kein Urobilinogen, kein Bilirubin; Urobilin in Spuren. Das mikroskopische Bild zeigte lediglich Spelzen und Holzbestandteile.

Der Kohlenstoff-Stickstoffquotient des Blutes unter normalen und unter experimentell gesetzten pathologischen Zuständen.

Von

Liborio Gomez (Manila).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 18. November 1925.)

(Mit 2 Abbildungen im Text.)

Die Untersuchung des C : N-Quotienten ist bisher nur im Urin zur Klarstellung von Stoffwechselstörungen herangezogen worden. Bei bestimmten Zuständen, die von *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* als dysoxydative Carbonurie bezeichnet werden, findet man eine Erhöhung dieses Quotienten, d. h. also eine Ausscheidung von verhältnismäßig mehr Kohlenstoff als Stickstoff. Zu diesen dysoxydativen Carbonurien gehören unter anderem besonders bestimmte Avitaminosen und der Diabetes. Für diese letztere Stoffwechselstörung geben *Bickel* und *Kauffmann* an, daß auch nach der Subtraktion des durch den Harnzucker bedingten hohen Kohlenstoffgehalts des Harns noch eine erhebliche Menge Kohlenstoff übrigbleibt, dessen Bindung vorläufig noch nicht geklärt ist, und dessen Vorhandensein sich nur durch den gesteigerten C : N-Quotienten verrät. Auch *Rosin* und *Alfthan* erhoben ähnliche Befunde beim Diabetes. Er ist auch nicht bedingt durch Substanzen wie Aceton, Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure. Es erschien daher aussichtsreich, die Untersuchungen gerade bei Stoffwechselstörungen, welche den Kohlehydratstoffwechsel betreffen, auch auf das Blut auszudehnen und festzustellen, ob auch bei der elementaranalytischen Bestimmung des Kohlenstoffs und des Stickstoffs im gesamten Blute und im enteiweißten Blute sich Abweichungen zeigen würden. Bei den Versuchen, die weiter unten ausführlich geschildert werden, wurde demnach das gesamte Blut auf seinen Gehalt an C und N untersucht, außerdem der C- und N-Gehalt des enteiweißten Blutes und schließlich der Blutzucker bestimmt. Aus der gefundenen Blutzuckermenge wurde die ihm entsprechende Kohlenstoffmenge berechnet,

diese von dem gesamten Restkohlenstoff abgezogen und dann das Verhältnis C : N gebildet. Der Blutzuckergehalt wurde bei den Berechnungen für das Vollblut vernachlässigt, da hier die fragliche Zuckerkohlenstoffmenge weit innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode lag. Derartige Analysen wurden angestellt bei normalen Hunden und bei phlorrhizinvergifteten Tieren, da ich auf diese Weise am leichtesten eine generelle Störung des Kohlehydratstoffwechsels zu erzielen hoffte; dann wurden die Untersuchungen ausgedehnt auf die Phosphorvergiftung und schließlich auf die totale Pankreasexstirpation[1]).

Die Analysen wurden in folgender Weise vorgenommen: Beim Vollblut wurde der Stickstoff nach *Kjeldahl* unter Verwendung von 1 ccm Blut bestimmt; der Reststickstoff nach der Mikrokjeldahlmethode unter Verwendung von etwa der zehnfachen Menge der bei *Bang* üblichen. Der Blutzucker wurde nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt und der Kohlenstoff nach der in dem hiesigen Laboratorium üblichen Methode der nassen Verbrennung nach *Tangl* und *Kereszky*. Hierbei wurde zur Bestimmung des Gesamtkohlenstoffs 1 ccm Blut, zur Bestimmung des Restkohlenstoffs das Filtrat von 30 bis 50 ccm Blut verwendet, das nach der *Folin*schen Methode mit Natriumwolframat und Schwefelsäure enteiweißt wurde. Jede Bestimmung wurde als Doppelbestimmung ausgeführt und nur dann verwertet, wenn die Ergebnisse tadellos übereinstimmten. Für die Kohlenstoffbestimmungen wurden zwei getrennte Apparate verwendet, deren Zuverlässigkeit wiederholt durch Probeanalysen bekannter Substanzen geprüft wurde.

Als Versuchstiere dienten Hunde von 10 bis 15 kg Körpergewicht, welche gegen 2 bis 3 Uhr nachmittags täglich eine gemischte Nahrung (Fleisch, Kartoffeln und Mohrrüben) in beliebiger Menge zu fressen bekamen. Die Blutentnahme geschah gewöhnlich zwischen 9 und 12 Uhr vormittags, so daß die Tiere vor der Blutentnahme 18 bis 22 Stunden nüchtern waren.

Nachdem die gesunden Tiere einigemal untersucht worden waren, wurden sie mit Phlorrhizin und Phosphor möglichst schwer vergiftet, um ausgesprochene Stoffwechselstörungen hervorzurufen. Wegen der flüchtigen Wirkung des Phlorrhizins wurde diese Substanz mehrmals täglich und ganz besonders einige Stunden vor der Blutentnahme injiziert. Bei den Tieren, denen das Pankreas entfernt wurde, wurde zufällig der Choledochus mit unterbunden, so daß die Tiere außer schwerem Diabetes auch noch einen Ikterus hatten. Die gesetzten

[1]) Versuche über den Harnquotienten C : N nach Abzug des Zucker-C bei der Phlorrhizin- und Adrenalinglykosurie sind zurzeit im hiesigen Laboratorium im Gange.

Stoffwechselstörungen gehören somit zu den schwersten, die sich im chronischen Versuch überhaupt prüfen lassen.

Ergebnisse.

Die Resultate sind in den Tabellen I und II zusammengestellt. Tabelle I enthält die normalen Werte. Außer Hund 5 und 6 waren die Tiere noch nie im Versuch gewesen. An diesen beiden Tieren waren einige Vorversuche mit Phlorrhizin unternommen worden zur Einübung der Methodik. Die Tiere hatten sich aber vollkommen erholt, und die Resultate müssen als normal angesehen werden. Die Ergebnisse dieser Vorversuche sind als nicht ganz einwandfrei nicht in der Zusammenstellung enthalten; es sind nur solche Zahlen angeführt, die nach völliger Beherrschung der Methode in übereinstimmenden Doppelanalysen gewonnen wurden.

Die Tabelle I zeigt, daß der C- und N-Gehalt des Gesamtblutes bei verschiedenen Tieren und auch bei dem gleichen Tiere zu verschiedenen Zeiten nicht konstant ist. Er hängt wahrscheinlich mit dem Kräftezustand zusammen, denn nach öfteren Blutentnahmen wird der C- und N-Gehalt kleiner. Dagegen bleibt der C : N-Quotient praktisch konstant und beträgt durchschnittlich 3,5.

Der Rest-C nach Subtraktion des Zucker-C schwankt zwischen 0,067 und 0,093 g pro 100 ccm Blut, Zahlen, die mit den Angaben von *Mancini* gut übereinstimmen, der Rest-N zwischen 0,021 bis 0,036 g in der gleichen Blutmenge. Der Rest-C : N-Quotient unter normalen Verhältnissen beträgt durchschnittlich 3,0, er schwankt zwischen 2,3 und 4,0.

In der Tabelle II sind die Blutanalysen der gleichen Tiere unter experimentellen pathologischen Zuständen enthalten. Das Blut wurde zu ganz verschiedenen Zeiten der Stoffwechselstörung entnommen.

Die phlorrhizinvergifteten Tiere waren folgendermaßen behandelt worden:

Hund 2. 0,6 g bei zweimaliger Injektion. Die letzte Injektion erfolgte 14 Stunden vor der Blutentnahme.

Hund 3. 0,3 g 72 Stunden und 0,3 g 18 Stunden vor der Blutentnahme.

Hund 4. 0,3 g 48 Stunden, 0,8 g 18 bis 24 Stunden und 0,6 g 2 Stunden vor der Blutentnahme. Der 1 Stunde vor der Blutentnahme entleerte Harn enthielt sehr reichlich Zucker.

Hund 5. Am 27. August 10 Uhr vormittags 0,2 g, 3 Uhr 30 Min. nachmittags 0,1 g, 5 Uhr 30 Min. nachmittags 0,3 g, um 10 Uhr nachmittags Blutentnahme, 12 Stunden nach der ersten Injektion. Der zu dieser Zeit entleerte Urin enthielt sehr reichlich Zucker. Der Hund machte einen schwerkranken Eindruck und wollte nicht fressen.

Am 28. August Harnzucker stark positiv. 12 Uhr mittags, 26 Stunden nach der ersten Phlorrhizininjektion, Blutentnahme. 4 Uhr nachmittags 0,3 g Phlorrhizin.

Am 29. August, 9 Uhr vormittags, 0,3 g Phlorrhizin. 12 Uhr mittags 50 Stunden nach der ersten Injektion, Blutentnahme. Nach 3 Stunden gestorben, die Autopsie unterblieb aus äußeren Gründen.

Wenn wir die an den Hunden 2, 3, 4 und 5 gefundenen Werte der Tabelle II mit den entsprechenden Normalwerten der Tabelle I vergleichen, so erkennen wir, daß zwar kleine Unterschiede bestehen, die aber nicht größer sind als die schon in der Norm bestehenden. Der durchschnittliche C : N-Quotient des Vollblutes bei der Phlorrhizinvergiftung beträgt 3,56. Der durchschnittliche C : N-Quotient des Restblutes beträgt 2,7, allerdings ist dieser Durchschnitt nur aus zwei Werten gewonnen, von denen der eine 2,0 und der andere 3,5 beträgt, Werte, welche beide als innerhalb der Norm liegend angesehen werden können.

Bei den Phosphorvergiftungen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Hund 4 war 25 Tage vor dem Versuch mit Phlorrhizin behandelt worden, hatte sich aber völlig erholt. Am 10. und 11. September je 0,4 ccm 1 proz. Phosphoröls. 15. September: Urin enthält etwas Eiweiß und Galle; Blutentnahme. 20. September: Das Tier wird entblutet. Bei der Obduktion wird fettige Degeneration der Leber, leichte fettige Veränderungen der Nieren, Ascites und Ödem der Beine festgestellt.

Hund 6. Am 8. September 2 ccm, am 9. September 4 ccm, am 10. September desgleichen Phosphoröls subkutan. Blutentnahmen am 9. September, einen Tag, und am 11. September, drei Tage nach der ersten Phosphorinjektion. Das Tier starb in der Nacht zum 12. September. Die Obduktion ergab ausgesprochene fettige Degeneration der Leber und der Nieren.

Die hierher gehörigen Zahlen der Tabelle II sind ungefähr die gleichen, wie sie bei den gleichen Tieren unter normalen Verhältnissen gefunden wurden, wie aus der Tabelle I hervorgeht. Der durchschnittliche Wert des C : N-Quotienten im Vollblut beträgt bei der Phosphorvergiftung 3,48, im Restblut 3,0. Es muß hervorgehoben werden, daß bei dem Hunde 6 drei Tage nach der ersten Phosphorinjektion der Restkohlenstoff und Reststickstoff stark zugenommen hatte, wobei der Rest-N verhältnismäßig stärker vermehrt war; der Quotient ist dementsprechend etwas kleiner.

Bei den Hunden 7 und 8 wurde das Pankreas exstirpiert. Bei den Operationen wurde der Choledochus mit unterbunden, so daß die Tiere ikterisch wurden. Das Blut wurde am zweiten, dritten und sechsten Tage nach der Operation untersucht. Bei den Tieren bestand eine sehr ausgesprochene Glykosurie. Die Analysen lassen keine Veränderungen gegenüber dem normalen Vollblut erkennen; der durchschnittliche Quotient beträgt 3,46. Der Blutzucker ist stark vermehrt, desgleichen der Rest-C und der Rest-N, der Quotient dagegen bleibt unverändert und beträgt 3,1 im Restblut.

In den geschilderten Versuchen wurden die Hunde sehr schweren experimentellen Störungen unterworfen, die geeignet waren, den

Tabelle I.

Normale Hunde. Mengen in g pro 100 ccm Blut.

Hund	Datum	Gesamtblut			Zucker		Gesamt-rest C	Restblut			Bemerkungen
		C	N	C/N	Menge	C		Rest-C — Zucker-C	N	C/N	
1	13. VII.	8,53	2,60	3,20	—	—	—	—	—	—	
2	26. VII.	9,25	2,37	3,38	0,089	0,035	—	—	—	—	
2	17. VIII.	9,42	2,52	3,73	0,091	0,036	0,117	0,081	0,036	2,2	
2	4. IX.	8,24	2,34	3,67	0,087	0,035	0,117	0,082	0,034	2,4	
3	31. VII.	10,44	3,01	3,46	—	—	—	—	—	—	
4	1. VIII.	10,27	2,80	3,66	0,090	0,036	—	—	—	—	
4	3. VIII.	8,27	2,20	3,75	0,107	0,043	0,128	0,085	0,024	3,5	
5	26. VIII.	8,60	2,52	3,43	0,085	0,034	—	—	—	—	Am 23. VII. Phlorrhizininjektion
6	8. IX.	11,57	3,30	3,50	0,084	0,033	0,108	0,075	0,021	3,5	Phlorrhizininjektion am 22. VII. und 19. VIII.
7	16. IX.	11,71	3,44	3,40	0,141	0,056	0,149	0,093	0,023	4,0	Morphiumnarkose
8	20. IX.	12,18	3,46	3,52	0,07	0,028	0,095	0,067	0,023	2,9	

C : N im Gesamtblut durchschnittlich 3,5, im Restblut 3,0.

Stoffwechsel tiefgreifend zu verändern. Sehr auffallend ist, daß die gefundenen Abweichungen im Verhalten des C : N-Quotienten hier so klein sind, daß sie fast noch innerhalb der Fehlergrenzen der Methoden liegen. Diese relative Konstanz des C : N-Quotienten weist darauf hin, daß zwischen dem C und N im Blute ein konstantes Gleichgewicht besteht. Dieses Gleichgewicht wird in der Norm und auch unter pathologischen Verhältnissen reguliert durch die Ausscheidungsorgane, speziell durch die Nieren, wenn es sich bestätigt, daß z. B. bei der Phlorrhizinvergiftung Rest-C : N im Harne erhöht wäre.

Aus den beiden Tabellen ersehen wir, daß bei jeder Vermehrung des Blutzuckers auch der Restkohlenstoff zunimmt, daß aber nach der Subtraktion des Zucker-C-Wertes die Schwankungen des Restkohlenstoffs den Schwankungen des Reststickstoffs entsprechen. Vielleicht ist der Hund 6 eine Ausnahme von dieser Regel, bei welchem am dritten Tage nach dem Beginn der Phosphorvergiftung der Rest-N unverhältnismäßig zunahm.

Im Hinblick auf die oben erwähnten Befunde bei diabetischen Urinen sind die C : N-Quotienten bei den pankreaslosen Hunden von

Tabelle II.

Pathologische Fälle. Mengen in g pro 100 ccm Blut.

Hund	Datum	Zeit seit Beginn der Störung	Vollblut			Zucker		Gesamtrest	Restblut		
			C	N	C/N	Menge	C	C	Rest-C – Zucker-C	N	C/N
					Plorrhizinvergiftung.						
2	5. IX.	18 Stunden	7,48	2,10	3,56	0,084	0,033	0,121	0,088	0,044	2,0
3	8. VIII.	3 Tage	9,82	2,80	3,50	0,093	0,038	—	—	—	—
4	21. VIII.	2 „	8,45	2,38	3,55	0,080	0,032	0,103	0,071	0,020	3,5
5	27. VIII.	12 Stunden	9,26	2,52	3,67	0,066	0,026	—	—	—	—
5	28. VIII.	26 „	9,50	2,52	3,77	0,098	0,039	—	—	—	—
5	29. VIII.	50 „	9,49	2,52	3,76	0,094	0,037	—	—	—	—
			Durchschnitt:		3,56				Durchschnitt:		2,7
					Phosphorvergiftung.						
4	15. IX.	5 Tage	7,62	2,33	3,27	0,095	0,038	0,101	0,063	0,017	3,7
4	20. IX.	10 „	7,57	2,20	3,44	0,124	0,050	0,134	0,074	0,028	2,8
6	9. IX.	1 Tag	10,55	2,87	3,70	0,122	0,048	0,116	0,068	0,021	3,2
6	11. IX.	3 Tage	11,78	3,37	3,50	0,087	0,035	0,215	0,180	0,079	2,3
			Durchschnitt:		3,48				Durchschnitt:		3,0
					Pankreasexstirpation.						
7	19. IX.	3 Tage	10,83	3,12	3,47	0,260	0,104	0,227	0,123	0,040	3,0
7	22. IX.	6 „	10,36	3,01	3,40	0,311	0,124	0,268	0,144	0,043	3,3
8	24. IX.	2 „	12,12	3,45	3,51	0,280	0,116	2,246	0,180	0,059	3,0
			Durchschnitt:		3,46				Durchschnitt:		3,1

besonderem Interesse. In den diabetischen Harnen fanden *Bickel* und *Kauffmann* eine Steigerung des C : N-Wertes, die nicht durch den C des Harnzuckers und der Acetonkörper bedingt war, gefunden.

Unsere diabetischen Hunde, die am Blute keine Steigerung des Quotienten erkennen lassen, hatten gleichzeitig auch einen Ikterus, so daß man einwenden kann, daß der Ikterus hier das Bild verschleiert hätte. Wir haben aber bei unseren phosphorvergifteten Hunden gesehen, daß der Ikterus den C : N - Quotienten nicht wesentlich ändert. Auch der Restquotient nach Abzug des Zucker-C, der bei der Hyperglykämie sehr beträchtlich ist, ändert sich bei Pankreasdiabetes nicht. Rest-C-Quotientbestimmungen im Harne beim experimentellen Pankreasdiabetes des Hundes liegen zwar noch nicht vor; aber es bleibt immerhin auffallend, daß trotz der gewaltigen Blutzuckererhöhung bei dieser Krankheit der Quotient Rest-C : N im Blute normal bleibt. Es ist die Frage, ob beim experimentellen Pankreasdiabetes des Hundes überhaupt eine Erhöhung des Harnquotienten im Rest-C : N vorkommt, und für den Fall, daß sie vorkommt, warum der übrige dysoxydable Kohlenstoff leichter ausgeschieden wird als der Zucker. Wenn die Erhöhung des Harnquotienten Rest-C : N aber nicht vorhanden sein sollte, dann müßte man daran denken, daß beim experimentellen Pankreasdiabetes eben der gesamte Kohlehydratabbau nur bis zum Zucker durchgeführt wird.

Zusammenfassung.

Bei gesunden Hunden und bei Hunden, die durch Vergiftung mit Phlorrhizin und Phosphor und durch Pankreasexstirpation tiefgreifende Stoffwechselstörungen erfahren hatten, wurde C und N im Gesamt- und im Restblut bestimmt und festgestellt:

1. daß der Gehalt des Gesamtblutes an C und N bei verschiedenen Hunden und bei dem gleichen Hunde zu verschiedenen Zeiten bestimmten Schwankungen unterliegt, daß aber der C : N-Wert hierbei praktisch konstant bleibt und durchschnittlich 3,5 beträgt. Im enteiweißten Blute schwankt der C : N-Quotient zwischen 2 und 4 und beträgt durchschnittlich 3.

2. Der C : N - Quotient des Gesamt- und Restblutes bleibt praktisch der gleiche nach wiederholten Aderlässen und nach schweren Stoffwechselstörungen, die durch Phlorrhizin- und Phosphorvergiftung sowie durch Pankreasexstirpation bewirkt sind.

3. Die Elementaranalyse des Blutes auf Kohlenstoff und Stickstoff ist nicht empfindlich genug, um pathologische Änderungen aufzudecken, die, wenn sie vorhanden sind, so klein sein müssen, daß sie innerhalb der Fehlergrenzen der Methoden liegen.

Methodik.

Die Bestimmung des Kohlenstoffs im Harne und Blute auf nassem Wege.

Erforderlich sind:

1. Ein Zersetzungskolben;
2. ein Verbrennungsrohr nach Art der zu Elementaranalysen verwendeten und ein dazu gehöriger Ofen. Ausreichend ist ein Dennstedtofen;
3. Absorptionsgefäße, bestehend aus einer großen $CaCl_2$-Ente und drei Natronkalk-U-Röhren;
4. Gaswaschflaschen, die mit konzentrierter H_2SO_4 beschickt sind;
5. eine Sauerstoffbombe mit Reduzierventil.

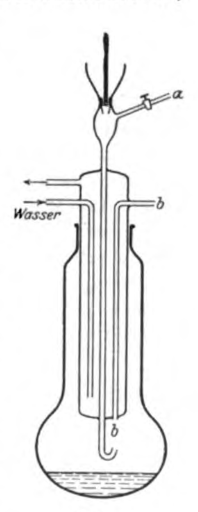


Abb. 1.

Der Bau des Zersetzungskolbens geht aus der Abb. 1 hervor. In ihn bringt man 10 bis 20 g Kaliumbichromat, welches durch vorheriges Schmelzen von Kohlenstoff befreit wurde und 5 bis 10 ccm des zu untersuchenden Urins. Dann werden die Glasverbindungen geschlossen und durch Einleiten von O_2 (Rohr *a*) die CO_2-haltige atmosphärische Luft verdrängt. In den Trichter, der durch einen eingeschliffenen Glasstab verschlossen ist, gießt man reinste konzentrierte Schwefelsäure und läßt durch vorsichtiges Anheben des Glasstabes die Säure tropfenweise durch den Schlitz treten. Sie gelangt durch das den Kühlmantel ganz durchsetzende Rohr *a* zu dem Harn und dem Bichromat und veranlaßt anfangs schon bei der Verdünnungswärme eine Zersetzung. Es entwickelt sich Gas, welches durch das Gasentbindungsrohr *b* in eine mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllte Gaswaschflasche *D* tritt. Aus dieser gelangt das Gas in das Verbrennungsrohr *E*, in dessen ersten Teil (s. Abb. 2) sich rotglühendes Kupferoxyd befindet (Abb. 2). Hier wird etwa vorhandenes CO zu CO_2 oxydiert. Das Gas kommt nun mit Bleisuperoxyd in der zweiten Hälfte des Rohres in Berührung, wobei sämtliche sauren Dämpfe (HCl,

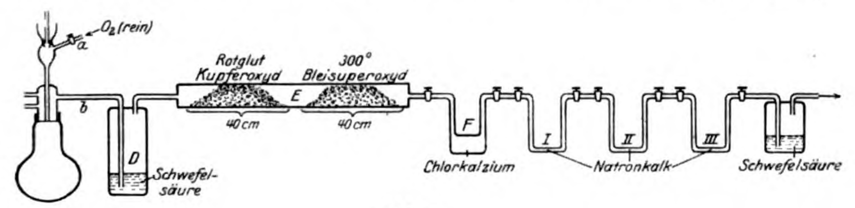


Abb. 2.

$N_2O_3 . SO_2$ usw.) sowie Cl zurückgehalten werden. Damit sich kein Bleicarbonat bildet, muß dieser Teil des Rohres ungefähr 300° heiß sein. Nach dem Austritt aus dem Rohre wird das Gas in einer großen Chlorcalciumente *F* von Wasser befreit (es ist notwendig, eine frisch gefüllte $CaCl_2$-Ente mit CO_2 zu füllen und nach 24stündigem Stehen mehrere Stunden mit Sauerstoff auszuwaschen; erst dann ist der Apparat zu Analysen verwendbar). Die trockene CO_2-, O_2-, N_2-Mischung streicht nun durch ein Natronkalkrohr I, in welchem der größte Teil der CO_2 absorbiert wird. Der Rest der CO_2 verbleibt in dem Natronkalkrohr II. Das dritte Natronkalkrohr III

dient zum Schutz gegen die Luftkohlensäure, deren Menge in Räumen, in denen solche Analysen ausgeführt werden, sehr beträchtlich werden kann. Es empfiehlt sich, hieran noch eine Schwefelsäure-Gaswaschflasche anzuschließen und an dieser mittels einer Wasserstrahlpumpe sanft zu saugen, und so im ganzen System einen Unterdruck von wenigen Zentimetern Wasser zu schaffen.

Wenn durch weiteren Zusatz von Schwefelsäure zu dem Reaktionsgemisch keine Gasentwicklung mehr erfolgt, beginnt man vorsichtig, den Kolben zu erwärmen. Man erhitzt schließlich bis zum Sieden (kenntlich an der SO_2-Entwicklung, die am Kühler wieder kondensiert wird). Die Reaktion ist beendet, wenn der Inhalt des Kolbens grün geworden ist. Man leitet dann mindestens 20 Minuten lang Sauerstoff durch den ganzen Apparat und bestimmt schließlich die entwickelte CO_2-Menge durch Wägung der beiden Natronkalkrohre I und II, nachdem sie 1 Stunde lang neben der Wage belassen waren. Die Rohre sollen stets mit Sauerstoff gefüllt sein. Im übrigen sind die aus den Handbüchern über analytische Chemie zu entnehmenden Kautelen streng zu beachten.

Bevor man an die Analyse eines Harns geht, muß man sich unter Verwendung von Substanzen mit bekanntem Kohlenstoffgehalt (Oxalsäure, Harnsäure, Traubenzucker) auf die Methode einarbeiten (nach *Tangl* und *Kereszky*, diese Zeitschr. **32**, 266, 1911.)

Literatur.

Tangl und *Kereszky*, diese Zeitschr. **32**, 266, 1911. — *Bickel* und *Kauffmann*, Deutsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 24. — *Dieselben*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 28. — *A. Bickel*, Med. Klinik 1925. — *Stefano Mancini*, diese Zeitschr. **26**, 149, 1910.

Die Messung der aktuellen Reaktion des Kapillarblutes mittels Chinhydronelektrode.

Von

Rudolf Schaefer.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Königsberg i. Pr.)

(Eingegangen am 18. November 1925.)

Bei der Prüfung der Chinhydronelektrode auf ihre klinische Brauchbarkeit durch *Schaefer* und *Schmidt* (1) ergaben sich so günstige Resultate, daß in dem neuen Verfahren eine Bereicherung der klinischen Arbeitsmethoden vermutet werden durfte. Inzwischen haben die Untersuchungen von *Mislowitzer* (2) zu gleich günstigen Ergebnissen geführt. Die obengenannte Prüfung (1) der Chinhydronelektrode war jedoch von Anfang an nur als eine Voruntersuchung gedacht, mit dem Ziele, eine klinisch brauchbare Methode zur Messung der aktuellen Reaktion des menschlichen *Blutes* auszuarbeiten.

Zwar gibt es mehrere Wege, auf denen die p_H des Blutes bestimmt werden kann, wobei in erster Linie die Arbeiten von *Hasselbalch* (3), *Michaelis* und *Rona* (4), *H. Straub* und *Kl. Meier* (5) u. a. zu nennen sind. Auch haben amerikanische Autoren, besonders *Corran* und *Lewis* (6) und nach ihnen *Mislowitzer* (2) schon Messungen am Blute mittels Chinhydronkette ausgeführt. Allen diesen Methoden aber haftet der Nachteil an, einmal, daß zur Blutgewinnung die Vene punktiert werden muß und Reihenuntersuchungen an demselben Individuum somit Bedenken haben, zum anderen erlaubt die aktuelle Reaktion gerade des Venenblutes nur sehr bedingte Rückschlüsse auf den grundlegenden Regulationsmechanismus, so daß Verfahren notwendig wurden, das Venenblut außerhalb des Körpers derjenigen CO_2-Spannung auszusetzen, die im arteriellen Blute herrscht.

Die direkte p_H-Messung im arteriellen Blute und ebenso diejenige im Kapillarblut verlangt, wenn sie exakt sein soll, vollkommenen Schutz vor Kohlensäureverlust. An dieser Forderung scheiterte die Bestimmung mittels Wasserstoffelektrode, wenn nicht der Gasraum der Elektrode in sehr schwierigen und zeitraubenden Vorbereitungen auf die CO_2-Spannung des Blutes gebracht worden war, wie *Hassel-*

balch (3) es in seinen Untersuchungen getan hat. Auch *Michaelis* und *Rona* (4) konnten trotz möglichster Verkleinerung des schädlichen Gasraumes die Fehlerquelle nicht ganz ausmerzen. In der Chinhydronelektrode dagegen, die keinen Gasraum im physikalischen Sinne hat. fiel diese Fehlerquelle ohne weiteres weg, und es lag also sehr nahe, mit ihrer Hilfe ein Verfahren zur direkten Messung der Blutreaktion auszuarbeiten. Der Einwand *Hasselbalchs* (7) gegen die direkte Messung, daß nämlich die Fehlerquelle der Methode an sich bedenklich groß sei im Verhältnis zu der Schwankungsbreite des Normalen, gilt natürlich auch hier, eine Wertlosigkeit der Methodik wird dadurch aber keineswegs bedingt, denn die Möglichkeit, Reihenuntersuchungen anzustellen, wie sie im folgenden beschrieben wird, läßt dafür in Zukunft Durchschnittswerte aus viel zahlreicheren Einzeluntersuchungen erwarten als es bisher möglich war. Messungen der aktuellen Reaktion des menschlichen Kapillarblutes, die unter exaktem Schutze vor CO_2-Verlust ausgeführt wurden, sind mir aus der Literatur nicht bekannt geworden. Dagegen zeigen die Untersuchungen von *Hess* (8) und seinen Schülern einerseits und die von *Atzler* (9) und seinen Schülern andererseits, daß in der Physiologie sowohl wie in der Pathologie wichtige Fragen mittels der direkten p_H-Messung im Kapillarblut in Angriff genommen werden können. Es soll daher im folgenden eine Methode beschrieben werden, die sich mit der genannten Aufgabe befaßt.

Da, wie schon gesagt, das Prinzip der Methode sich auf die Chinhydronkette aufbaut, so muß, um eine Wiederholung zu vermeiden, auf die zusammenfassende Darstellung der grundlegenden, auf *Haber* und *Russ* (10) zurückgehenden Untersuchungen verwiesen werden, die in der Arbeit von *Schaefer* und *Schmidt* (1) aufgeführt sind. Auch die Einzelheiten der Arbeitsweise, wie sie in den vorliegenden Untersuchungen angewandt wurde, ist dort beschrieben.

Es wurde auch diesmal die Kompensationsapparatur nach *Poggendorf* in der Modifikation von *Michaelis* und als Nullinstrument ein Kapillarelektrometer angewandt. An den Elektroden dagegen hatten sich inzwischen Änderungen als vorteilhaft erwiesen. Als Vergleichselektrode wurde zwar weiterhin die Chinhydronvergleichselektrode von *Veibel* benutzt, aber nicht mehr ein Platinblech, sondern ein einfacher, etwa 0,7 mm starker und etwa 10 mm langer Platindraht in die Vergleichsflüssigkeit eingetaucht. Diese Drahtelektrode war, wie üblich, in eine Glasröhre eingeschmolzen, in deren Lumen der Draht etwas hineinragte, und dort wurde mittels Quecksilber die ableitende Verbindung hergestellt. Das Elektrodengefäß, welches das zu messende Blut aufnahm, entsprach in seiner Form der früher beschriebenen Mikroelektrode, doch so verkleinert, daß zur Füllung 3 bis 4 Tropfen Blut genügten. Auch eine einfachere Form des Elektrodengefäßes

fand Verwendung, bei der der Platindraht, der einerseits als Elektrode frei in das Lumen des Aufnahmegefäßes ragte, auf der anderen Seite nicht in einem abführenden, Quecksilber gefüllten Glasrohr endete, sondern frei herausragte und durch eine Klemmschraube mit der Apparatur verbunden wurde. Jedenfalls ist es empfehlenswert, mehrere Elektrodengefäße vorrätig zu haben, damit die Säuberung möglichst häufig und möglichst gründlich durchgeführt werden kann, wobei man sich am besten konzentrierter Schwefelsäure, die mit Kaliumbichromat gesättigt ist, bedient. Das Nachspülen mit doppelt destilliertem Wasser muß häufig und gründlich ausgeführt werden, und es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die wassergefüllte Elektrode vor erneuter Benutzung einigemal in den Stromkreis einzuschließen. Die Gefäße sind bei Nichtbenutzung mit doppelt destilliertem Wasser zu füllen.

Angeregt durch die günstigen Erfahrungen der amerikanischen Autoren *Corran* und *Lewis* (6), denen auch *Mislowitzer* (2) folgt, wurden Versuche mit Feingoldelektroden angestellt. Im Gegensatz zu den oben genannten Untersuchern konnten keine Vorteile gegenüber der Platinelektrode festgestellt werden. Im Gegenteil, die Goldelektrode war gegen alle möglichen Störungen viel empfindlicher, und das Potential stellte sich langsamer ein als beim Platin. Es wurden daher alle hier verwerteten Versuche mit unplatinierten Platindrahtelektroden ausgeführt.

Die wesentlichste Änderung gegen früher betrifft die Elektrolytverbindung zwischen den beiden Elektroden. Die Benutzung von U-Röhrchen als Heber bewährte sich nicht. Es wurden daher Röhrchen verwandt, die mit KCl-Agar gefüllt waren, und zwar wurde ohne zwischengeschaltete wässerige KCl-Lösung eine direkte Verbindung von der einen Elektrode zur anderen durch ein Röhrchen mit KCl-Agar hergestellt. Verwendet wurde reinster Agar-Agar, der im Dampftopf filtriert war, in einer Konzentration von 5 Proz. Dazu wurde reinstes KCl bis zur Sättigung zugesetzt und damit die Röhrchen, die weiter unten beschrieben werden, gefüllt. Luftblasen mußten natürlich vermieden werden. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Röhrchen in gesättigte, wässerige KCl-Lösung mit überschüssigem KCl als Bodenkörper gelegt. Hier blieben sie. Benutzt wurden sie erst einige Tage nach der Herstellung, und zwar nur etwa drei- bis viermal, dann verworfen. Das Glasrohr selbst war U-förmig, etwa 4 bis 5 mm stark und von mittlerer Wandstärke. Mit dem einen Schenkel reichte das Verbindungsrohr bis auf den Boden des Vergleichselektrodengefäßes. Der andere Schenkel war in eine nicht zu dünne Kapillare ausgezogen, deren Ende rechtwinklig umgebogen und dann hart an der Biegung abgeschnitten wurde. Durch die Verjüngung des Verbindungsrohres konnte ein bequemes Einpassen in die Mikroelektrode erreicht werden.

Das Umbiegen am Ende verhinderte ein Aufspießen auf die frei ins Lumen ragende Drahtelektrode. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß besonders in dem kapillaren Anteil des Verbindungsrohres beim Einsaugen des Agars keine Luftblasen entstehen dürfen.

Zur Vervollständigung der Apparatur ist jetzt nur noch der Luftthermostat zu erwähnen, in dem sich die beiden Elektrodengefäße bei der Messung befanden. Die Wände eines Kastens wurden mit dicken Filzlagen isoliert und an der Vorderwand eine kleine dicht schließende Tür angebracht. Im Thermostatenraum selbst, der mit einer Kohlenfadenlampe geheizt wurde, sorgte ein schnell rotierender Propeller für die Durchmischung der Luft. Die Temperatur, bei der die Messungen vorgenommen wurden, betrug 37°.

Die eigentliche Messung mit ihren Vorbereitungen wird auf folgende Weise ausgeführt: Die Vergleichselektrode ist gebrauchsfertig gemacht. Auf den Boden des Mikroelektrodengefäßes legt man mittels einer Platinöse eine kleine Menge Chinhydron, welches vorher mit einer Natriumoxalatlösung angefeuchtet worden ist. Die genaue Zusammensetzung dieser Natriumoxalatlösung ist folgende: Zu einer 0,8proz. Kochsalzlösung wird 1 Proz. reinstes Natriumoxalat zugefügt und gelöst. Dieselbe Lösung, die man am besten in einer Tropfbürette vorrätig hält, findet noch an einer anderen Stelle Verwendung. Es ist wichtig, daß zur Herstellung doppelt destilliertes Wasser, das durch Auskochen kohlensäurefrei gemacht ist, verwandt wird. Über das angefeuchtete Chinhydron auf dem Boden des Elektrodengefäßes schichtet man 1 bis 2 Tropfen reinstes Paraffinum liquidum, am praktischsten aus einer Rekordspritze, die mit Kanüle armiert ist. Nach diesen Vorbereitungen, denen naturgemäß die Eichung des Akkumulators in der Apparatur vorausgehen muß, wird ein dünnwandiges Glasröhrchen, das etwa 3 mm lichte Weite und etwa 10 cm Länge hat, und das an dem einen Ende in eine nicht allzu dünne Kapillare von etwa 2 cm Länge ausgezogen ist, mit einem Tropfen Paraffinum liquidum beschickt, so daß die Kapillare und der Anfangsteil des weiten Rohres ohne Luftblasen gefüllt sind. Aus der Tropfbürette saugt man nun einen kleinen Tropfen der oben beschriebenen Natriumoxalatlösung von der Spitze in die Kapillare ein, so daß das Paraffin zurückgedrückt wird. Es muß nochmals betont werden, daß eine ganz kleine Menge Natriumoxalatlösung nicht nur genügt, sondern daß zuviel Flüssigkeit die Genauigkeit des Resultats ungünstig beeinflußt. Auch diese Vorbereitung ist damit beendet. Nun wird die Fingerbeere des Patienten, dessen Blut untersucht werden soll, gründlich mit Alkohol gereinigt, und dann sticht man, nachdem der Alkohol verdunstet ist, mit einem scharfen und nicht zu schmalen Lanzettmesserchen ziemlich tief ein. In die Wunde führt man das oben beschriebene Glasröhrchen mit

der kapillaren Spitze, in der sich die Natriumoxalatlösung luftblasenfrei befindet, ein, und zwar so tief, daß zwar einerseits die Öffnung der Kapillare nicht durch das blutende Gewebe verstopft wird, andererseits jedoch keine Verbindung mehr mit dem Luftraum besteht. Die Art dieses Einführens muß ausprobiert werden, da von der Exaktheit dieser Maßnahme die Genauigkeit des Resultats abhängig ist. Nach dem Einführen senkt man das äußere, freie Ende der Kapillare ein wenig unter die Horizontale, so daß das Blut einströmt. Dabei vermischt es sich mit der Natriumoxalatlösung, bleibt aber andererseits durch das Paraffin vom Luftraum abgeschlossen. Wenige Tropfen Blut, die auf die beschriebene Weise in dem Glasröhrchen gesammelt werden, genügen für die Bestimmung. Wenn nun genügend Blut in das Glasröhrchen eingelaufen ist, so zieht man die Spitze aus der Wunde heraus und verschließt das weite Ende des Röhrchens fest mit dem Finger. Jetzt wird die Spitze der Kapillare in das Elektrodengefäß unter das Paraffin geführt, woraufhin man das Blut langsam unter das Paraffin ausfließen läßt, indem man den Finger von dem weiten Ende des Röhrchens abnimmt. Bei dem Einfließen des Blutes in das Elektrodengefäß vermischt es sich mit dem schon vorher dort eingefüllten Chinhydron, wobei die Durchmischung durch die vorherige Anfeuchtung des Chinhydrons mit Natriumoxalatlösung erheblich beschleunigt wird. Das Einfließen des Blutes unter das Paraffin muß nicht zu schnell und vor allen Dingen ganz ohne Rühren geschehen, weil sonst die ziemlich erhebliche Adsorptionsfähigkeit des Paraffins für Gase sich als Fehlerquelle bemerkbar macht. Es ist noch nachzutragen, daß die kapillare Spitze des oben beschriebenen Röhrchens so lang sein muß, daß sie bequem bis auf den Boden des Elektrodengefäßes hinabreicht, d. h. also bis vollständig unter das Paraffin. Andererseits darf der Boden des Elektrodengefäßes nicht spitz zulaufen, sondern muß so flach sein, daß man ohne Schwierigkeit das Blut unterschichten kann. Das Röhrchen, in dem das Blut aus der Fingerbeere aufgesogen wird, ist am besten nach einmaligem Gebrauch zu verwerfen. Wenn das Elektrodengefäß auf die beschriebene Weise mit Blut gefüllt ist, so ist es fertig zur Messung. Es wird in den Luftthermostaten gesetzt und die Verbindung einerseits zur Apparatur mittels eines Kupferdrahtes hergestellt und andererseits mittels des beschriebenen Agarröhrchens zur Vergleichselektrode. Dann führt man die Messung in der bekannten Weise aus, wobei darauf zu achten ist, daß sich das Potential schnell und exakt einstellt, und prüft in einigen Zeitabständen die Konstanz des Potentials nach. Die Anwärmung im Thermostaten braucht nur kurze Zeit durchgeführt zu werden, da sich bei der Kleinheit des Gefäßes und der sehr geringen Flüssigkeitsmenge der Temperaturausgleich sehr schnell herstellt. Die Vergleichselektrode, das Paraffin,

das Agarröhrchen und die Klammern, welche die Mikroelektrode halten, befinden sich natürlich schon vorher im Thermostaten und sind dort vorgewärmt, ebenso die leere Mikroelektrode vor der Blutentnahme.

Die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse, soweit sie sich auf experimentelle oder krankhafte Veränderungen der p_H des Blutes beziehen, sollen an anderer Stelle zusammengestellt werden. Hier interessieren neben den Normalzahlen auch einige Resultate aus den vorbereitenden Messungen. So ist zu erwähnen, daß Novirudin als Zusatz bei Messungen der aktuellen Reaktion nicht geeignet ist. Versuche an nicht gepufferten und schwach gepufferten wässerigen Lösungen zeigten, daß ein Zusatz von Novirudin die Reaktion nach der alkalischen Seite hin verschiebt. Selbst in Verdünnungen, in denen das Novirudin die Gerinnung des Blutes nicht mehr zuverlässig verhindert, ist noch ein Einfluß auf ungepufferte Lösungen feststellbar. Dagegen ist aus den Untersuchungen von *Michaelis* und *Davidoff* (11) bekannt, daß Hirudinzusatz zum Blute keinen wesentlichen Fehler bei der Wasserstoffionenkonzentrationsmessung bedingt. Am besten bewährte sich bei den vorliegenden Untersuchungen reinstes Natriumoxalat nach *Sörensen*, das in der oben angegebenen Konzentration auch bei Verwendung kleinster Flüssigkeitsmengen mit Sicherheit die Gerinnung des Blutes verhindert.

Was nun die p_H-Werte im Kapillarblut gesunder Menschen anbelangt, wie sie mit der hier beschriebenen Methode gefunden wurden. so zeigt sich eine befriedigende Übereinstimmung mit denjenigen Werten, die für das arterielle Blut als feststehend gelten, d. h. also, der Wasserstoffexponent, gemessen bei 37° C, schwankt zwischen den Grenzwerten 7,30 und 7,40. Anscheinend ist die normale Schwankungsbreite der aktuellen Reaktion im Kapillarblut etwas größer als im arteriellen, jedoch bedarf das erst der Bestätigung durch viel größeres Material. Auch muß betont werden, daß scheinbar geringfügige Fehlerquellen, wie z. B. leichte Stauung des Armes bei der Blutentnahme aus der Fingerbeere, oder warme Handbäder von Einfluß sind. Aber gerade das Ansprechen der Methode auf solch wenig eingreifende Maßnahmen einerseits und die Möglichkeit andererseits, durch Reihenuntersuchungen das Normale vom experimentell Veränderten zu trennen, lassen daran denken, daß auf dem hier beschriebenen Wege Resultate von einiger Bedeutung gewonnen werden können.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode beschrieben, die es gestattet, mittels Chinhydronkette die aktuelle Reaktion des Kapillarblutes unter strengster Wahrung des natürlichen CO_2-Gehaltes zu messen.

2. Die p_H-Werte im Kapillarblut des gesunden Menschen stimmen mit den Ergebnissen, die am arteriellen Blute gewonnen wurden, befriedigend überein.

Literatur.

1) *Schaefer* und *Schmidt*, diese Zeitschr. **156**, 1925. — 2) *Mislowitzer*, ebendaselbst **159**, 1925. — 3) *Hasselbalch*, ebendaselbst **30**, 1910. — 4) *Michaelis* und *Rona*, ebendaselbst 18, 1909. — 5) *H. Straub* und *Kl. Meier*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **129**, 1919. — 6) *Corran* und *Lewis*, Biochem. Journ. 18, 1924. — 7) *Hasselbalch*, diese Zeitschr. 78, 1916. — 8) *Hess*, Erg. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **28**, 1923. — 9) *Atzler* und *Lehmann*, Pflügers Arch. **190**, 1921. — 10) *Haber* und *Russ*, Zeitschr. f. physik. Chem. 47, 1904. — 11) *Michaelis* und *Davidoff*, diese Zeitschr. **46**, 1912.

Über die Refraktion der Serumeiweißkörper und die Individualität von Albumin und Globulin.

Von

O. Arnd und **E. A. Hafner.**

(Aus der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel.)

(Eingegangen am 19. November 1925.)

Inhaltsübersicht.

A. Über die Refraktion der Serumeiweißkörper.

I. Fragestellung.

E. Reiss (1) hat 1904 wohl zum erstenmal das Brechungsvermögen der Eiweißkörper zu ihrer Charakterisierung und quantitativen Bestimmung (2) (3) zu verwenden versucht. Das Brechungsvermögen von verschiedenen Eiweißkörpern ist dann besonders durch *T. B Robertson* (4) untersucht und quantitativ zu einer Mikroeiweißbestimmungs-

methode ausgearbeitet worden (5). Diese Methode hat in der Folge wegen ihrer Einfachheit und Genauigkeit mannigfache Verwendung gefunden. In neuerer Zeit haben sich methodisch mit der refraktometrischen Eiweißbestimmung besonders beschäftigt *F. Rohrer* (6) (7), *W. Berger* und *L. Petschacher* (8), *B. S. Neuhausen* und *D. M. Rioch* (9), und *E. A. Hafner* (10). Es hat sich dabei übereinstimmend ergeben, daß die refraktometrische Eiweißbestimmungsmethode nach *T. B. Robertson* unter Einhaltung gewisser Kautelen genügend genaue Werte liefert, und zwar sowohl für das Gesamteiweiß, wie für das relative Albumin-Globulinverhältnis. Kürzlich haben *W. Starlinger* und *K. Hartl* (11) die Methode erneut einer Kritik unterzogen und kommen zu dem Schluß, daß die Eiweißbestimmungsmethode nach *T. B. Robertson* unbedingt abzulehnen sei. Fast gleichzeitig erschien eine Arbeit von *B. Chalier* und *Chevalier* (12), die dieselbe Methode zur Eiweißbestimmung als sehr geeignet empfahl, und sehr wenig später eine größere Arbeit von *L. Beltz* und *E. Kaufmann* (13), die sich das Brechungsvermögen der Eiweißkörper bei der interferometrischen Eiweißbestimmung zunutze machten.

Da wir uns seinerzeit (10) eingehend mit der refraktometrischen Eiweißbestimmungsmethode befaßt hatten und wir im Begriff waren, auf Grund dieser früheren Untersuchungen eine größere Arbeit auszuführen, sahen wir uns durch die Publikation von *W. Starlinger* und *K. Hartl* veranlaßt, nochmals auf die Methodik zurückzukommen. Neben der rein methodischen Seite war die Frage auch insofern von theoretischem Interesse, als damit zur Diskussion gestellt war, ob dem Gesamteiweiß und seinen Fraktionen ein charakteristischer Brechungsquotient zukomme oder nicht; mit anderen Worten, es verknüpfte sich damit gleichzeitig die vielumstrittene Frage nach der chemischen Individualität der Albumine und Globuline.

II. Methodisches.

Definiert man diejenigen Eiweißkörper, die aus genuinem Serum durch Halbsättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ ausgesalzen werden, als Globuline, und diejenigen, die in dem Intervall von $^1/_2$ bis $^1/_1$ $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung ausfallen, als Albumine, so stehen naturgemäß die verschiedensten Methoden zur quantitativen Bestimmung der Serumeiweißkörper zur Verfügung. *W. Starlinger* und *K. Hartl* (11) benutzten als Standardmethode das gravimetrische Verfahren. Der durch $(NH_4)_2SO_4$-Aussalzung erhaltene Niederschlag wurde ausgewaschen, dann einmal mit kaltem Alkohol und Äther gespült, zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Wurden nun die so erhaltenen Gewichtsprozente Eiweiß in den Brechungsquotienten der zugehörigen Eiweißlösung unter Abzug der Restrefraktion dividiert, so erhielten die Autoren mit dieser

Methode Werte für den Brechungsanteil von 1 g-Proz. Eiweiß, wie sie bis jetzt noch nie beobachtet worden sind. Nun hatte schon *Böhme* (14) ziemlich beträchtliche Differenzen zwischen dem gravimetrisch bestimmten und durch *Kjeldahl* ermittelten Eiweißgehalt bemerkt, und erst als er zur Entfernung der Fette und Phosphatide heißen Alkohol und Äther verwendete, erreichte er eine genügende Übereinstimmung. *W. Starlinger* und *K. Hartl* geben ferner selbst an, daß es ihnen auch bei ihrer modifizierten Methode nicht gelungen ist, den Eiweißverlust beim Waschen völlig auszuschließen. Der Eiweißverlust ist aber abhängig vom Dispersitätsgrad und der Zahl der gefällten Eiweißteilchen. Aus den Untersuchungen von *L. Cikanek*, *J. Havlik* und *F. Kubanek* (15) geht aber mit Sicherheit hervor, daß der Dispersitätsgrad des Eiweißkoagulums auch bei Verwendung ein und desselben Fällungsmittels und unter Konstanthaltung aller übrigen Faktoren bei verschiedenen pathologischen Zuständen, wie z. B. Nephritis chronica, Ascites, Hämoglobinämie usw. im weitesten Maße variiert. Dem entspricht natürlich eine ebenso weitgehende Verschiedenheit des Eiweißverlustes bei der gravimetrischen Eiweißbestimmung in verschiedenen Seren, während natürlich Kontrollbestimmungen in ein und demselben Serum gute Übereinstimmungen unter sich ergeben können und deshalb in bezug auf die Genauigkeit der Methode kein bestimmtes Urteil gestatten. Es schien uns deshalb angezeigt, von der gravimetrischen Bestimmung Abstand zu nehmen und zunächst zu untersuchen, ob nicht die kjeldahlometrische Albumin- und Globulinbestimmungsmethode, wie sie in unserem Institut schon lange geübt wurde (10), als Standardmethode zu verwenden sei.

Zur N-Bestimmung benutzten wir eine titrimetrische Mikromethode unter Verwendung des Kjeldahlapparats mit Silberkühler nach *I. Bang* (16). Verschiedene technische Verbesserungen bei der Veraschung und Destillation, wie sie *F. Pregl* (17) und *Parnas* und *Heller* (18) beschrieben, machten wir uns dabei zunutze. Zur Rest-N-Bestimmung wurde das Eiweiß quantitativ durch Natriumwolframat und Schwefelsäure nach dem Verfahren von *Folin* und *Wu* (19) und *Folin* (20) gefällt und im Filtrat der Rest-N nach Mikrokjeldahl titrimetrisch bestimmt. Bei der Titration verwendeten wir Präzisionsbüretten mit einer Ablesegenauigkeit von $^1/_{20}$ ccm, so daß $^1/_{100}$ ccm noch mit Leichtigkeit geschätzt werden konnte. Titriert wurde gegen Methylrot mit sorgfältigst mit Na_2CO_3 eingestellten n/50 Lösungen. Kurz vor der Titration wurden die Destillate aufgekocht, da der Umschlag dadurch schärfer wurde (17). Zur Gesamt-N-Bestimmung wurde stets 0,1 ccm Serum verascht; zur Rest-N-Bestimmung verwendeten wir meist 1 ccm Serum und zur jeweiligen Veraschung 3 ccm Filtrat. Stets wurde durch blinde Versuche der N in den Reagenzien

kontrolliert und berücksichtigt. Unter Einhaltung aller Kautelen erreichten wir nach dieser Methode eine genügende Genauigkeit, so daß die stets angestellten Kontrollen selten um mehr als $^1/_{100}$ bis $^3/_{100}$ ccm n/50 Lauge differierten. Zeigten sich größere Differenzen, so wurden die Bestimmungen entsprechend vermehrt, so daß die Genauigkeit aller Versuche ungefähr dieselbe blieb.

Da die nach *Kjeldahl* auf titrimetrischem Wege ermittelten Eiweißwerte als die weitaus zuverlässigsten anzusehen sind, hat man auch versucht, dieselbe Methode zur Bestimmung der Albumine und Globuline zu verwenden. Die Verwendung von $(NH_4)_2SO_4$ bei der fraktionierten Salzfällung macht aber diese Methode unmöglich. Andererseits hat *G. Kauder* (21) gezeigt, daß das Quantitative der Aussalzung von der Art des Salzes abhängig ist, so daß das $(NH_4)_2SO_4$ nicht ohne weiteres durch irgend ein anderes N-freies Neutralsalz ersetzbar ist. Einige Jahre später fanden *O. Porges* und *K. Spiro* (22), daß die Globuline auch durch ½ Sättigung mit Na_2SO_4 oberhalb 30° quantitativ ausgesalzen werden. Vor einigen Jahren hat dann *P. E. Howe* (23) (24) diese Methode für die Mikrobestimmung adaptiert und in einer Reihe von Arbeiten mit Erfolg verwendet. *W. Starlinger* und *K. Hartl* (11) dagegen fassen die mit ihrer gravimetrischen Methode neuerdings gewonnenen Erfahrungen über die Na_2SO_4-Aussalzung der Globuline folgendermaßen zusammen (S. 125): „Die Na_2SO_4-Fällung gibt um vieles geringere Eiweißmengen, als die $(NH_4)_2SO_4$-Aussalzung. Daraus ergibt sich der Schluß, daß ein Ersatz der $(NH_4)_2SO_4$-Fällung durch die Na_2SO_4-Fällung nicht angezeigt erscheint.“

Die Frage der Ersetzbarkeit des $(NH_4)_2SO_4$ durch das Na_2SO_4 bei der Aussalzung der Globuline läßt sich heute bei sorgfältigem Arbeiten unschwer mit Hilfe der Refraktometrie mit großer Genauigkeit entscheiden. Die gesättigte $(NH_4)_2SO_4$-Lösung muß, wie *E. P. Pick* (25) schon angibt und was *K. Samson* (26), *J. Csapo* und *D. v. Klobusitzky* (134) neuerdings wieder mit Recht hervorheben, neutral sein, was man am besten dadurch erreicht, daß man heiß sättigt und dann bei Zimmertemperatur das $(NH_4)_2SO_4$ sich langsam auskristallisieren läßt und eventuell mit NH_3 nachträglich noch neutralisiert. Bei der refraktometrischen Bestimmung der Eiweißkörper mit der $(NH_4)_2SO_4$-Aussalzung verfuhren wir genau nach den Angaben von *T. B. Robertson* (4) mit der Modifikation: 1. daß die individuelle Restrefraktion für jedes Serum besonders bestimmt wurde; 2. daß für jede Untersuchungsserie der Brechungsquotient der Verdünnungsflüssigkeiten jedesmal neu ermittelt wurde. Bezüglich weiterer Details der Technik der refraktometrischen Untersuchung verweisen wir auf frühere Arbeiten aus unserem Institut sowie auf die Untersuchungen von *E. Reiss* (2) (3), *W. Berger* und *L. Petschacher* (8) und auf das Buch von *F. Löwe* (27).

Gearbeitet wurde mit dem Eintauchrefraktometer von *Zeiss* (Hilfsprisma I), Ablesungen bei 17,5°, nach Temperaturausgleich.

Die Aussalzung mit Na_2SO_4 wurde bei 37° mit bei 37° gesättigter Na_2SO_4-Lösung ausgeführt. Filtriert wurde ebenfalls bei 37°. Wegen der starken Verdunstung stellt hier die refraktometrische Analyse ganz besonders hohe Anforderungen bezüglich Raschheit und Genauigkeit im Arbeiten. Als geeignet erwies sich auch das Arbeiten in einer feuchten Kammer oder unter Paraffin. Besonders bei der Na_2SO_4-Aussalzung erwies es sich als unumgänglich notwendig, immer parallel den Brechungsquotienten der Verdünnungsflüssigkeit zu bestimmen.

III. Vergleich der Na_2SO_4-Fällung mit der $(NH_4)_2SO_4$-Fällung und ihre Brauchbarkeit für die kjeldahlometrische Albumin-N-Bestimmung.

Es wurde nun zunächst die Ersetzbarkeit des $(NH_4)_2SO_4$ durch das Na_2SO_4 zur Aussalzung der Globuline refraktometrisch an verschiedenen Tierseren untersucht. Hat eine bei Zimmertemperatur halbgesättigte Ammonsulfatlösung dieselbe fällende Kraft wie eine bei 37° halbgesättigte Natriumsulfatlösung, dann müssen offenbar die Brechungsquotienten der Filtrate nach Abzug der Restrefraktion und der Verdünnungsflüssigkeiten bei Verwendung desselben Serums identisch sein. Ein weiteres Mittel zur Erkennung der Gleichwertigkeit dieser beiden Salze in bezug auf ihre globulinfällende Kraft ist das Verhalten des Brechungsanteils von 1 Proz. Albumin, der sogenannten spezifischen Albuminrefraktion. Wegen Raumersparnis begnügen wir uns mit der Wiedergabe eines Protokolls von Kalbsserum C (Tabelle I); die Messungen an anderen Tierseren ergab prinzipiell dasselbe Resultat.

Tabelle I.

	Brechungsanteil des Gesamtalbumins	Albumin Proz.	Spez. Albuminrefraktion
$(NH_4)_2SO_4$	0,008 63	$3,79_6$	0,002 27
Na_2SO_4 sofort . . .	0,008 26	$3,79_6$	0,002 18
„ $1^1/_2$ Std. bei 37°	0,009 54	$3,79_6$	0,002 52

Führte man die Na_2SO_4-Aussalzung und die Filtration unter Paraffin oder in der feuchten Kammer aus, so ergab sich in beiden Fällen die spezifische Refraktion von 0,00223.

Aus Tabelle I ergibt sich somit: Die Brechungsanteile der Filtrate sind nach Abzug der Restrefraktion und der Verdünnungsflüssigkeiten identisch, wenn die Aussalzung der Globuline mit Halbsättigung von $(NH_4)_2SO_4$ oder mit Halbsättigung von Na_2SO_4 bei 37° vorgenommen wird. Beim Na_2SO_4-Filtrat zeigt sich sehr rasch der Einfluß der Verdunstung im Steigen des Brechungsanteils. Immerhin ist die Ver-

dunstung nach $1^1/_2$ Stunden noch nicht so bedeutend, daß dies auch einen Einfluß auf den kjeldahlometrisch bestimmten Eiweißgehalt hätte. Schließt man die Verdunstung aus, so ist die spezifische Refraktion des Albumins, das man durch $(NH_4)_2SO_4$ vom Globulin geschieden hat, gleich der spezifischen Refraktion des Albumins, das man durch Na_2SO_4 isoliert hat.

Damit ist gezeigt, *daß die Na_2SO_4-Aussalzung der Globuline zur kjeldahlometrischen Albumin-N-Bestimmung nach Pinkus* (137) *und K. Spiro* (22) *die $(NH_4)_2SO_4$-Fällung quantitativ zu ersetzen vermag.* Unsere Resultate stehen in guter Übereinstimmung mit denjenigen von *P. E. Howe* (23). Vermutlich beruht die Divergenz zwischen den Angaben von *W. Starlinger* und *K. Hartl* und unseren Befunden darauf, daß jene sich der gravimetrischen Methode bedienten.

Auf Grund unserer Untersuchungen ergibt sich nun folgendes einfache Verfahren zur Bestimmung der spezifischen Refraktion der Serumeiweißkörper: Vermittelst der Na_2SO_4-Aussalzung bei 37° wird das Serum zur kjeldahlometrischen N-Analyse fraktioniert; während zur Refraktionsbestimmung wie bisher die sehr geeignete und bequeme $(NH_4)_2SO_4$-Aussalzung verwendet wird.

IV. Das Verhalten der Restrefraktion im menschlichen Serum.

Die älteren Autoren, die sich zuerst mit der refraktometrischen Eiweißbestimmung beschäftigten, *E. Reiss* (1), *T. B. Robertson* (4) (5), dann auch *F. Rohrer* (6) (7) nahmen an, daß der Brechungsanteil der Nichteiweißkörper im Serum eine konstante Größe darstelle, mit anderen Worten, daß die individuelle Schwankung der Restrefraktion ohne allzu großen Fehler zu vernachlässigen sei. Unseres Wissens haben *B. S. Neuhausen* und *D. M. Rioch* (9) sowie *W. Berger* und *L. Petschacher* (8) zuerst darauf aufmerksam gemacht, daß die Restrefraktion ziemlich bedeutende individuelle Schwankungen zeigt. *E. A. Hafner* (28) hat kürzlich gezeigt, daß der Brechungsquotient der Ultrafiltrate von verschiedenen Rinderseren zwischen 0,00173 und 0,00201 liegen kann und die Bedeutung der Schwankung der Nichteiweißkörper im Serum für den Kolloidzustand des Euglobulins analysiert. Wir müssen aber betonen, daß nur unter ganz bestimmten Bedingungen Zusammensetzung und Konzentration des Ultrafiltrats dem realen Lösungsmittel des Eiweißes entsprechen; mit anderen Worten, *es kann aus der Analyse des Ultrafiltrats nicht ohne weiteres auf das Dispersionsmittel eines kolloiden Systems geschlossen werden,* was übrigens auch aus den früheren Diffusionsversuchen von *P. Rona* und *H. Petow* (29) hervorgeht. Tabelle II enthält einen Vergleich zwischen Brechungsanteil der Nichteiweißkörper, bestimmt nach *T. B. Robertson* (Restrefraktion), und dem Brechungsanteil des Ultra-

filtrats, gewonnen mit der Methode nach *G. Giemsa* (30) von Schweineseren.

Tabelle II.

Nr.	Restrefraktion	Ultrafiltrat	$n \Delta\ 10^{-4}$
1	0,002 03	0,002 15	1,2
2	0,003 05	0,002 22	8,3
3	0,002 51	0,002 22	2,9
4	0,002 87	0,002 25	6,2
5	0,002 86	0,002 32	5,4

Der Brechungsanteil des Ultrafiltrats und die Restrefraktion eines Serums können nicht immer identisch sein, da bei der Ultrafiltration infolge der negativ geladenen, nicht dialysablen Eiweißkörper sich ein Donnangleichgewicht ausbildet, d. h. es kommt zu einer ungleichen Elektrolytverteilung.

Tabelle III enthält die Restrefraktion einiger klinischer Fälle, ferner den Rest-N, ausgedrückt in Milligramm N pro 100 ccm Serum. Die zugehörige klinische Diagnose wird später unter derselben Nummer aufgeführt.

Tabelle III.

Nr.	Restrefraktion	Rest-N	Nr.	Restrefraktion	Rest-N
1	0,002 11	56	11	0,002 09	20,4
2	0,002 21	152	12	0,002 44	34,4
3	0,001 98	22,4	13	0,002 26	44,8
5	0,002 06	22,4	14	0,001 85	23,2
6	0,002 17	28,0	15	0,001 68	44,8
7	0,002 08	30,8	16	0,002 24	28,0
8	0,002 33	36,4	17	0,001 76	46,2
9	0,003 04	29,9	18	0,002 27	32,2
10	0,001 95	29,9	19	0,002 45	28,0
			20	0,001 92	36,4

Aus Tabelle III geht einmal hervor, daß der Rest-N unverändert sein kann (Nr. 9, 10), während die Restrefraktion einen großen Unterschied aufweist; umgekehrt kann die Restrefraktion dieselbe sein (Nr. 2, 16) und im Rest-N-Spiegel eine große Differenz bestehen; mit anderen Worten, *Rest-N und Elektrolytgehalt schwanken individuell und unabhängig voneinander ganz bedeutend. Asada* (31) und *K. Tadenuma* (32) konnten bei gesunden Hunden, die mit einer an Kalorien- und Vitamingehalt zureichenden Kost ernährt wurden, zeigen, daß der Salzgehalt der Nahrung den Energiewechsel und den Eiweißumsatz deutlich beeinflußt. Unsere Befunde zusammen mit denjenigen von *Asada* und *Tadenuma* besagen somit, daß *die pathologisch veränderte biochemische Reaktionsweise des menschlichen Organismus mit einer Ver-*

schiebung aller Gleichgewichte einhergeht, die sich ohne weiteres im Verhalten der Restrefraktion und des Rest — N spiegelt.

Tabelle IV enthält eine Zusammenstellung der von den verschiedenen Autoren beobachteten Schwankungsbreite und die Mittelwerte der Restrefraktion.

Tabelle IV.

Schwankungsbreite	Mittelwert	Autoren
0,002 00—0,00 260		*B. S. Neuhausen* u. *D. M. Rioch* (9)
0,002 14—0,00 268 *) 0,001 38—0,00 408 **)	0,002 36	*W. Berger* u. *L. Petschacher* (8)
	0,001 98	*P. E. Howe* (24)
0,002 69—0,00 292	0,002 77	*R. Reiss* (1)
0,001 89—0,00 229	0,002 06	*F. Rohrer* (6), (7)
0	0,001 57	*T. B. Robertson* (5)
0,002 08—0,00 376	0,002 40	*W. Starlinger* u. *K. Hartl* (11)
0,001 68—0,00 304	0,002 11	Eigene Werte

*) Normal. — **) Krank.

Tabelle IV illustriert sehr instruktiv die enorme Schwankungsbreite der Restrefraktion. Da die mittlere Gesamtrefraktion des Eiweißes im Serum etwa 0,01500 beträgt, so ergibt sich, daß die Restrefraktion zwischen 10 bis 25 Proz. des Brechungsanteils des Gesamteiweißes variieren kann. *Es muß deshalb bei jeder refraktometrischen Eiweißanalyse die individuelle Restrefraktion besonders bestimmt werden.* Wir betonen dies deshalb, weil es immer wieder übersehen wird. Ganz kürzlich empfehlen *J. Beltz* und *E. Kaufmann* (13) eine interferometrische Eiweißbestimmungsmethode, wobei die Autoren Konstanz des Brechungsanteils der Nichteiweißkörper voraussetzen, den Eiweißgehalt in ihren Tabellen aber in Gramm-Prozenten auf drei Stellen (!) nach dem Komma aufführen.

V. Über die spezifische Refraktion des Gesamteiweißes und seine Schwankungen.

Der Brechungsanteil pro 1 g-Proz. Gesamt-Serumeiweiß oder die spezifische Refraktion des Gesamteiweißes wird von den verschiedenen Autoren verschieden angegeben (Tabelle V), und es fragt sich, inwieweit es sich hier um eine konstante Größe handelt. Von vornherein ist dies eigentlich nicht zu erwarten.

Tabelle V.

Spez. Rest des Gesamteiweißes	Untersucher
0,001 72	*Reiss* (1)
0,001 95	*Robertson* (5)
0,001 78	*Rohrer* (6) (7)
0,001 96	*W. Starlinger* und *K. Hartl* (11)
0,002 10	Eigener Wert

Die spezifische Refraktion des Gesamteiweißes setzt sich zusammen aus der spezifischen Refraktion des Albumins und des Globulins, und da nach den meisten Messungen die spezifische Refraktion des Globulins um einen gewissen Betrag über der spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes wie die des Albumins darunter liegt, ist es sehr wahrscheinlich, daß extreme Werte des Albumin-Globulinquotienten zu merklichen Abweichungen führen können. Es ist weiter allgemein bekannt, daß der Albumin-Globulinquotient nicht nur unter pathologischen Bedingungen, sondern auch normal von Individuum zu Individuum außerordentlich stark schwankt, und demzufolge läßt sich auch eine gewisse Schwankung der spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes erwarten. Es fragt sich nur, welches Ausmaß die individuelle Schwankung erreicht und durch welche Bedingungen sie hinreichend bestimmt wird.

Nun geben *W. Starlinger* und *K. Hartl* (11) Zahlen für die spezifische Gesamteiweißrefraktion, die, wenn sie zutreffen, nicht nur für die Methodik, sondern auch für Physiologie und Pathologie von hoher Bedeutung sind. Diese Autoren haben an wahllos herausgenommenem klinischen Material mit ihrer gravimetrischen Methode Werte der spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes zwischen 0,00177 und 0,00258 gefunden, also eine Schwankungsbreite von 0,00079 oder rund $^2/_5$ des Mittelwertes. Sie kommen auf Grund ihrer gravimetrischen Untersuchungen zu dem Resultat, daß von einer einheitlich konstanten spezifischen Refraktion überhaupt nicht gesprochen werden kann. Da uns aber nicht nur das Ausmaß, sondern vor allem auch die Bedingungen dieser Schwankungen interessierte, haben wir unser klinisches Material nach ganz bestimmten Gesichtspunkten (Alter, Geschlecht, pathologischer Zustand) ausgewählt und analysiert.

Tabelle VI enthält Prozente Gesamteiweiß, nach *Kjeldahl* bestimmt, desgleichen nach *Robertson*, und die Abweichungen vom Kjeldahlwert, desgleichen mit unserem Mittelwert berechnet, und die Abweichungen vom Kjeldahlwert, Alter und Geschlecht des Patienten und klinische Diagnose des Falles. Tabelle VII enthält die individuelle spezifische Refraktion des Gesamteiweißes, die Abweichungen vom Mittelwert $|\Delta|$ und den relativen Globulinquotienten (d. h. Gesamteiweiß = 100).

Bei der Analyse der Tabellen VI und VII ist folgendes herauszuheben: Hohes Alter (16, 18) ohne schwerere Komplikationen und mit normalem relativen Globulingehalt zeigen eine mittlere spezifische Refraktion; jüngere Individuen (7, 12, 19, 21) haben eine mittlere, teils eine schwach verminderte spezifische Refraktion: im wesentlichen scheint das Alter des Individuums ohne Einfluß auf die spezifische Refraktion des Eiweißes zu sein; ebenso das Geschlecht. Extreme

Tabelle VI.

Fall	Alter Jahre	Geschlecht	Diagnose	*Kjeldahl* Proz.	*Robertson*	Δ_R	Eigener Wert	Δ_E
1	16	♀	Chlorose	6,30	6,63	0,33	6,16	0,14
2	22	♂	Urämie	6,55	7,84	1,29	7,28	0,73
3	26	♀	Imbecillitas	5,79	6,45	0,48	5,99	0,02
4	8	♀	Psoriasis univ.	8,82	—	—	—	—
5	51	♀	Psoriasis	7,36	7,57	0,21	7,03	0,33
6	63	♂	Omarthritis	7,11	7,38	0,27	6,81	0,30
7	22	♂	Gesund	7,85	7,90	0,05	7,34	0,51
8	?	♂	Urämie	7,29	7,86	0,57	7,78	0,49
9	52	♀	Cholecystitis	8,05	8,15	0,10	7,57	0,48
10	47	♀	Diabetes mell.	7,06	7,80	0,74	7,73	0,67
11	25	♀	Abort	5,86	6,76	0,91	6,27	0,41
12	21	♂	Nephrose	7,50	7,65	0,15	7,10	0,40
13	27	♂	Polyarthritis	7,33	8,04	0,71	7,47	0,14
14	21	♂	Ödem	7,12	6,90	0,22	6,40	0,72
15	26	♂	Pleuritis exs.	7,36	7,82	0,46	7,27	0,09
16	73	♂	Lumbago	7,08	7,46	0,38	6,93	0,15
17	52	♂	Ödem	6,25	7,12	0,87	6,61	0,36
18	73	♂	Aorteninsuff.	6,66	7,30	0,69	6,78	0,12
19	26	♂	Thrombopenie	6,53	6,06	0,47	5,63	1,00
20	69	♀	Gangrän	6,58	7,65	1,07	7,05	0,47
21	25	♀	Lues lat.	7,24	7,72	0,48	7,65	0,41
						$\frac{\Sigma\|\Delta\|}{n} = 0,52$		$\frac{\Sigma\|\Delta\|}{n} = 0,39$

Tabelle VII.

Fall	Alter Jahre	Geschlecht	Diagnose	Rel. Globulin	Spez. Refraktion des Gesamteiweißes	$\|\Delta\|$
1	16	♀	Chlorose	—	0,002 05	0,000 05
2	22	♂	Urämie	—	0,002 33	0,000 23
3	24	♀	Imbecillitas	—	0,002 10	0,000 00
5	51	♀	Psoriasis	41,7	0,002 01	0,000 09
6	63	♂	Omarthritis	45,3	0,002 01	0,000 09
7	22	♂	Gesund	35,2	0,001 96	0,000 14
8	?	♂	Urämie	38,5	0,002 10	0,000 00
9	52	♀	Cholecystitis	38,1	0,001 98	0,000 12
10	47	♀	Diabetes mell.	36,1	0,002 16	0,000 06
11	25	♀	Abort	32,0	0,002 24	0,000 14
12	21	♂	Nephrose	39,6	0,001 99	0,000 11
13	27	♂	Polyarthritis	41,3	0,002 14	0,000 04
14	21	♂	Ödem	25,7	0,002 38	0,000 28
15	26	♂	Pleuritis exsud.	39,0	0,002 07	0,000 03
16	73	♂	Lumbago	37,4	0,002 05	0,000 05
17	52	♂	Ödem	29,1	0,002 22	0,000 12
18	73	♂	Aorteninsuff.	37,3	0,002 14	0,000 04
19	26	♂	Thrombopenie	31,1	0,001 81	0,000 29
20	69	♀	Gangrän	—	0,002 25	0,000 15
21	25	♀	Lues lat.	37,0	0,002 08	0,000 02

Werte des relativen Globulingehalts *können* mit einer extremen spezifischen Refraktion verbunden sein (14), doch ist ein abnormer relativer

Globulingehalt noch keine hinreichende Bedingung für eine starke Veränderung der spezifischen Refraktion (6), und umgekehrt (19); auch das Blutbild gibt keinen deutlich erkennbaren Zusammenhang, und trotzdem ist eine Schwankung der spezifischen Refraktion unverkennbar. Es liegt nahe, eine Beziehung zwischen der Variation der Restrefraktion und der der spezifischen Eiweißrefraktion zu vermuten, da ja auch z. B. viskosimetrisch der Einfluß der Nichteiweißkörper auf die Proteine nachgewiesen werden konnte (28). Ein Vergleich mit Tabelle III läßt aber keinen Zusammenhang erkennen, sondern *die spezifische Refraktion des Gesamteiweißes ergibt sich innerhalb des physiologisch-pathologischen Geschehens als unabhängig von den Nichteiweißkörpern des Serums.* Selbst intensive p_H-Änderungen, wie man sie in vitro durch Zugabe von Säuren oder Alkali erreichen kann, beeinflussen die Gesamtrefraktion des Eiweißes nicht. Tabelle VIII zeigt den Einfluß der p_H auf Pferdeserum. Ebenso haben die Salze keinen Einfluß (Tabelle IX, Rinderserum).

Tabelle VIII.

Zusammensetzung	Brechungsanteil des Gesamteiweißes	p_H
Serum + n/10 H_2SO_4 $\overline{aa}$	0,008 06	4,1
„ + H_2O $\overline{aa}$ . . .	0,008 29	7,5
„ + n/10 NaOH $\overline{aa}$	0,008 09	9,8

Tabelle IX.

Zusatz	Brechungsarbeit des Gesamteiweißes
4 proz. KCl . .	0,012 63
6 proz. $CaCl_2$.	0,012 63
n/15 KH_2PO_4 .	0,012 84
H_2O	0,012 70

Vergleicht man die Summe der Abweichungen der individuellen spezifischen Refraktion vom Mittelwert:

$$\sum^{+} \Delta = 0{,}001\,06. \qquad \sum^{-} \Delta = 0{,}000\,79,$$

so läßt sich im Zusammenhang mit den eben angestellten Erörterungen vermuten, daß die Schwankungen der spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes von „*zufälliger*" *Natur* sind. Das Intervall, in dem sich die spezifische Refraktion des Gesamteiweißes bei unserem Material bewegt, liegt zwischen 0,00181 und 0,00238, die Variationsbreite

somit 0,00057 oder rund ¼ des Mittelwertes. Unter obiger Voraussetzung berechnet sich die mittlere Schwankung des Mittels S_μ und die mittlere Schwankung jeder individuellen spezifischen Refraktion S_i zu

$$S_\mu = \pm 0{,}00003 \text{ oder etwa } \pm 1{,}5 \text{ Proz. des Mittelwertes,}$$
$$S_i = \pm 0{,}00013 \text{ oder etwa } \pm 6{,}5 \text{ Proz. des Wertes.}$$

Es ist eine ganz allgemeine Eigenschaft der organisierten Welt, daß sie stets eine gewisse Variabilität zeigt, und zwar sowohl in morphologischer wie in funktioneller Hinsicht. Jedes biologische Gesetz wird dadurch bis zu einem gewissen Grade zu einem Wahrscheinlichkeitsgesetz, jede biochemische Konstante zu einer Variablen, und es erscheint zunächst unmöglich, zur Aufstellung exakter Normen zu gelangen. In unserem speziellen Falle liegen die Verhältnisse aber ziemlich einfach: Vergleichen wir die Variabilität der spezifischen Refraktion mit der Streuung irgend einer morphologischen Größe [z. B. ist der Corneadurchmesser in dieser Hinsicht ziemlich genau untersucht (33)], so ergibt sich, daß auch im ungünstigsten Falle die Streuung der spezifischen Refraktion noch fünfmal kleiner ist als der des Corneadurchmessers.

Praktisch aber ergibt sich aus unseren Feststellungen, *daß die refraktometrische Eiweißbestimmungsmethode, wo keine größere Genauigkeit als 0,3 bis 0,5 Proz. Eiweiß verlangt wird, in den meisten Fällen weitaus genügend genaue Resultate liefert.* Unser Ergebnis bestätigt unsere früheren Untersuchungen (10) über denselben Gegenstand sowie die Ergebnisse von *W. Berger* und *L. Petschacher* (8).

VI. Von der spezifischen Refraktion der Serumeiweißfraktionen.

Die spezifische Refraktion des Gesamteiweißes im Serum ist eine komplexe Größe. Sie setzt sich zusammen aus der spezifischen Albuminrefraktion und der spezifischen Globulinrefraktion. Die Schwankungen der spezifischen Gesamteiweißrefraktion haben wir als „zufällige" bezeichnet. Wenn nun auch zwischen Albumin-Globulinquotienten und spezifischer Refraktion des Gesamteiweißes sich keine eindeutige Beziehung ergab, so wäre es doch möglich, daß die Variation der spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes ihren Grund in einer ziemlich beträchtlichen Schwankung der spezifischen Refraktion der Albumine und Globuline haben könnte. *W. Starlinger* und *K. Hartl* (11) haben wohl zum erstenmal bei ihren methodischen Untersuchungen mit vollem Nachdruck auf die Inkonstanz der Brechungsanteile (pro Gramm) der Albumine und Globuline hingewiesen. Und in der Tat scheint dies, soweit uns bis jetzt unser Untersuchungsmaterial ein Urteil hierüber gestattet, der Fall zu sein.

Wir geben in Tabelle X nur eine Auswahl besonders extremer Werte:

Tabelle X.

	Spezifische Refraktion des	
	Albumins	Globulins
Mensch (14)	0,001 65	0,002 57
„ (16)	0,002 12	0,001 94
„ (13)	0,001 48	0,003 07
Schwein	0,001 85	0,002 34
Rind	0,002 87	0,001 18

Es scheint nach Tabelle X, daß es sogar Fälle gibt, wo das gegenseitige Verhältnis der Brechungsanteile von Albumin und Globulin (pro 1 g) verschoben ist. Die Untersuchungen von *F. Obermeyer* und *R. Willheim* (34) (35) haben ergeben, daß auch der Aminoindex der Albumine und Globuline bei ein und derselben Tierart beträchtlich schwankt, dasselbe zeigt der Brechungsindex; offenbar handelt es sich dabei um gewisse *konstitutive Oszillationen, die bei der Bildung der Serumeiweißkörper aus Zelleiweiß gewissermaßen „sortiert" werden.* Die vacillonide Natur [*R. Zsigmondy* (103)] der Serumeiweißkörper läßt den letzten Vorgang als *eine Entmischung von Zelleiweiß und Serumeiweiß* verstehen, wobei dann je nach den übrigen physikalischen und chemischen Bedingungen etwas verschieden konfigurierte Albumine und Globuline entstehen. *H. Handovsky* (36) hat vor kurzem darauf hingewiesen, daß die Struktur der Sekundärteilchen des Serumeiweißes bei Krankheiten verändert ist.

T. B. Robertson (4) hat beobachtet, daß die spezifische Refraktion des Globulins durch Säuren, Alkali, Alkohol und Aceton bei nicht zu hohen Konzentrationen kaum geändert wird. Erst bei höheren Konzentrationen von Alkohol und Aceton zeigt sich auch in der Abnahme des Brechungsexponenten die Verminderung der Teilchenzahlen. Wir entnehmen der Arbeit von *T. B. Robertson* (4) folgende Zahlen (Tabelle XI).

Tabelle XI.

1 Proz. Globulin in	Spezifische Globulinrefraktion	1 Proz. Globulin in	Spezifische Globulinrefraktion
n/40 KOH . .	0,002 27	25 proz. Alkohol	0,002 02
n/40 HCl . . .	0,002 30	50 proz. „	0,001 19
25 proz. Aceton	0,002 27	50 proz. Aceton	0,001 46

Die Tabellen VIII, IX und XI zeigen, daß die Serumeiweißkörper, wenn sie einmal in die Blutbahn eingelaufen sind, die Tendenz haben, ihr chemisches Gefüge festzuhalten, und es bedarf dann für eine Änderung chemischer oder physikalischer Art bereits relativ energischer Eingriffe.

Auch dies spricht sehr für die Auffassung, *daß die beobachteten Konfigurationsschwankungen der Bluteiweißkörper im Augenblick ihrer Entmischung aus dem Zelleiweiß manifest werden.*

Unter den verschiedensten pathologischen Zuständen beobachtet man in vivo absolute und relative Verschiebungen der Serumeiweißfraktionen. Es ist auch gelungen, in vitro ganz analoge Veränderungen in der Aussalzbarkeit der Serumeiweißkörper zu erzeugen, die je nachdem als Globulin- oder Albuminvermehrung bzw. als Überführung des einen Eiweißkörpers in den anderen imponierte. Merkwürdigerweise hatte man dabei immer mehr oder weniger bewußt die Vorstellung, daß, wenn eine Umwandlung auf irgend einem Wege gelänge, damit auch die Individualität der Eiweißkörper dahinfalle. Aber wer denkt heute, wenn aus Glykogen Milchsäure entsteht, an eine Identität beider Körper?

R. R. Henley (37) und *H. Kürten* (38) haben gefunden, daß unter dem Einfluß von Formaldehyd in vitro eine relative Verschiebung der Aussalzbarkeit der Serumeiweißfraktionen eintritt, die als Globulinvermehrung gedeutet werden könnte. Ähnliches beobachtete man beim Erwärmen von Serum, beim Schütteln und Bestrahlen. *E. Adler* und *L. Strauss* (39) (40) fanden, daß Coffein, Alkohol und Aceton im Serum in vitro eine deutliche Globulinverminderung bewirkt.

Nun hat bei allen diesen Versuchen die Interpretation ihre Schwierigkeiten: Es handelt sich darum, zu entscheiden, ob unter der Einwirkung dieser Einflüsse in vitro eine *wirkliche* Globulinvermehrung oder -verminderung stattgefunden hat oder nicht. Die Frage ist deshalb so schwierig zu entscheiden, weil wir das Mittel, womit wir die Eiweißfraktionen darstellen, auch zu ihrer Identifizierung benutzen, und so läuft man dauernd im Kreise herum.

Die sorgfältige refraktometrische Analyse gestattet hier aber fast immer in eindeutiger Weise die Entscheidung zu liefern. Wir haben seinerzeit (10) auf refraktometrischem Wege nachgewiesen, daß die von *L. Moll* (135) zuerst beschriebene, bei der Erwärmung auftretende Serumveränderung keine wahre Globulinvermehrung darstellt. Dasselbe Resultat gaben die chemischen Untersuchungen von *R. B. Gibson* (41), die immunologischen von *G. Fanconi* (42) (bei *Doerr*), und kürzlich kommt auch *L. Petschacher* (43) zu derselben Ansicht.

Die Versuche von *R. R. Henley*, *E. Adler* und *L. Strauss* haben uns als Grundlage gedient. Die Angaben dieser Autoren über den Sinn der Verschiebung in der Aussalzbarkeit der Serumfraktionen konnten wir bestätigen. Die refraktometrische Analyse an Rinderseren ergab folgendes (Tabelle XII):

Der Alkohol scheint das Eiweiß chemisch in der angewandten Konzentration am wenigsten zu beeinflussen; die spezifische Refraktion

Tabelle XII.

	Rest-refraktion	Δ 10^{-4}	Albumin-gesamt-refraktion	Albumin Proz.	Spezifische Albumin-refraktion
Nullversuch	0,001 36	—	0,006 80	2,35	0,002 89
0,6 proz. Coffein	0,001 30	— 0,6	0,008 48	3,31	0,002 56
3 proz. C_2H_5OH	0,001 45	+ 0,9	0,007 16	2,41	0,002 96
0,6 prom. Cholesterin + 3 proz. C_2H_5OH .	0,001 02	— 3,4	0,001 79	2,36	0,007 59
2,4 proz. $HC{\lessgtr}^{O}_{H}$ . . .	0,001 19	— 1,7	0,006 99	2,29	0,003 05

des Albumins hat um 7 Einheiten zugenommen, die des Globulins um 12 Einheiten abgenommen. Die beobachtete Vermehrung der Albumine beruht demnach nicht mit Sicherheit auf einer wahren Albuminzunahme. Das Coffein bewirkt ebenfalls eine Abnahme der Aussalzbarkeit der Globuline. Dabei zeigt sich, daß sowohl die spezifische Refraktion des Albumins wie des Globulins deutlich vermindert ist. Coffein beeinflußt also nicht nur kolloidchemisch die Serumeiweißkörper, es ändert nicht nur ihr hydrodynamisch wirksames Volumen, wie *H. Handovsky* (44), *A. Ellinger* (45), *S. M. Neuschloss* (46) und *E. A. Hafner* (28) gezeigt haben, sondern es *ändert auch die Konfiguration* der Albumine wie die der Globuline. Auch Cholesterin scheint eine wesentliche Änderung in der spezifischen Refraktion der Eiweißkörper zu bewirken. Daß die Eiweißkörper durch Formaldehyd angegriffen werden, hat schon *L. Schwarz* (47) gezeigt und ist heute eine allgemein bekannte Tatsache. Auch hier ist die spezifische Refraktion der Albumine enorm geändert.

Zusammenfassend ergibt sich hieraus, daß es *bis heute in keinem einzigen Versuch in vitro gelungen ist, sicher Albumine in Globuline umzuwandeln, oder umgekehrt.* Die verschiedenen Eingriffe chemischer oder physikalischer Art führen wohl zu Veränderungen in der Aussalzbarkeit, sie beeinflussen aber auch die spezifische Refraktion, d. h. sie denaturieren das Eiweiß.

VII. Lecithin und Eiweiß. Ein Beitrag zur Konstitution des heterogenetischen Antigens.

Im Anschluß an die vorhergehenden Versuche wurde ein Lecithinsol mit Serum versetzt. Als Ausgangslösung diente ein 1 proz. Lecithinsol, hergestellt nach *O. Porges* und *E. Neubauer* (47) aus *Merck*schem Ovolecithin. 5 ccm wurden mit 15 ccm Pferdeserum versetzt und 20 Stunden im Eisschrank stehengelassen. Ebenso wurden entsprechende Kontrollen angesetzt und hierauf refraktometrisch analysiert. Ebenso wurde mit Rinderserum verfahren. Es zeigte sich: Die Restrefraktion blieb unverändert, mit anderen Worten, bei der Hitze-Essigsäure-

Koagulation wird das Lecithin mit dem Eiweiß quantitativ gefällt. Der Brechungsanteil des Lecithins in der Lösung betrug 0,00012. Die $(NH_4)_2SO_4$-Fraktionierung ergab nun folgende Verhältnisse, ausgedrückt durch den Brechungsquotienten $n \cdot 10^{-5}$ (Tabelle XIII):

Tabelle XIII.

	Pferd		Rind	
	Serum unbehandelt	Lecithin-Serum	Serum unbehandelt	Lecithin-Serum
Gesamteiweiß	1090	1090	925	925
Albumin	644	832	680	757
Globulin	446	258	245	158

Das kann zweierlei heißen:

1. Lecithin bewirkt in vitro eine Globulinverminderung.
2. Globulin wird durch Lecithin gegen die $(NH_4)_2SO_4$-Aussalzung geschützt.

Die erste Möglichkeit erledigt sich im folgenden von selbst. Zur weiteren Untersuchung des zweiten Punktes stellten wir eine durch Ultrafiltration und Elektrodialyse weitgehend gereinigte, aber physikochemisch völlig intakte Rinderglobulinlösung her. Über Darstellung und Eigenschaften der reinen Globulinlösung vgl. (48). Es wurden nun zunächst vier zehngliedrige geometrische Verdünnungsreihen mit gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung mit dem Quotienten $10^1/_9$ hergestellt (Tabelle XIV).

Tabelle XIV.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
$(NH_4)_2SO_4$ ges. ccm	0,1	0,13	0,17	0,21	0,28	0,36	0,46	0,60	0,77	1,00
H_2O . . . . . . ccm	0,9	0,87	0,83	0,79	0,72	0,64	0,54	0,40	0,23	0,00
Sättigung								$^2/_3$		$^1/_1$
	Euglobulin							Euglobulin + Pseudoglobulin		

Diese Verdünnungsreihen wurden nun mit folgenden Lösungen zu je gleichen Teilen versetzt:

A. Gereinigte Globulinlösung (0,79proz.) + H_2O . . . . 1 : 1
B. „ „ (0,79 „) + Lecithinsol . . . . . . 1 : 1
C. „ „ (0,79 „) + 64proz. Rohrzucker . . 1 : 1
D. „ „ (0,79 „) + 50proz. $CO(NH_2)_2$ . . . 1 : 1

Es bedeuten im folgenden: 0 = klar, ♀ = Opaleszenz, + = kräftige Trübung, ++ = Flockung, +++ = vollständige Aussalzung.

Tabelle XV.
Aussalzungsbild gleich nach dem Vermischen.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
A	0	0	0	0	0	+	++	++	+++	+++
B	0	0	0	0	0	0	0	+	+++	+++
C	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	+	++	+++	+++	+++
D	0	0	0	0	0	0	0	++	++	+++

Tabelle XVI.
Aussalzungsbild nach 3 Stunden.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
A	0	0	0	0	+	+	+++	+++	+++	+++
B	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++
C	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	+	+++	+++	+++	+++
D	0	0	0	0	0	0	$\overset{+}{0}$	+++	+++	+++

Tabelle XVII.
Aussalzungsbild nach 36 Stunden.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
A	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	++	+++	+++	+++	+++	+++
B	0	0	0	0	0	++	+++	+++	+++	+++
C	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	$\overset{+}{0}$	+	+++	+++	+++	+++
D	0	0	0	0	0	0	$\overset{+}{0}$	+++	+++	+++

Das Resultat ist sehr deutlich: *Lecithin schützt die Euglobuline vor der Aussalzung, der Schutz ist ziemlich intensiv und noch nach 36 Stunden deutlich nachzuweisen.* Harnstoff hat ebenfalls schützende Wirkung; Rohrzucker im Gegenteil sensibilisiert, nur kommt es zu keiner intensiven Teilchenvereinigung, da die hohe Viskosität des Lösungsmittels dies verhindert. Es fragt sich, wie man sich die schützende Wirkung des Lecithins vorzustellen hat. Harnstoff und Zucker wirken bekanntlich nicht als solche auf das Eiweiß ein. Nach der Aussalzungstheorie von *E. A. Hafner* und *L. v. Kürthy* (49) läßt sich aber das entgegengesetze Verhalten von Harnstoff und Rohrzucker qualitativ ohne weiteres verstehen: Die Ionenaktivität des aussalzenden Stoffes und die Polarisierbarkeit des auszusalzenden Körpers im Verhältnis zur Polarisierbarkeit seines Lösungsmittels sind für den Aussalzungseffekt maßgebend. Nach *R. Fürth* (50) erhöht Harnstoff die *Dielektrizitätskonstante* des Wassers, und Rohrzucker setzt sie herab. Da nun nach *R. Keller* (51) das gelöste Eiweiß eine höhere D.K. als das Wasser hat, wird durch Zusatz von *Harnstoff* seine relative Polarisierbarkeit

verkleinert, es wird schwerer ausgesalzen, es wird geschützt; durch Rohrzuckerzusatz sinkt umgekehrt die Polarisierbarkeit des Wassers, die relative Polarisierbarkeit des Eiweißes wird vergrößert, die Aussalzung tritt bei geringerer Salzkonzentration ein, das Eiweiß wird sensibilisiert. Offenbar kommt dieser Mechanismus für die Wirkung des Lecithins nicht in Frage. Es fragt sich deshalb, was es hier für Möglichkeiten gibt.

Durch die Untersuchungen von *P. Kyes* (52) (53), *J. Morgenroth* und *U. Carpi* (54) (55) ist gezeigt worden, daß die Toxine der Kobra, der Biene und des Skorpions bei Behandlung mit Lecithin stärker hämolytisch wirken. Gleichzeitig zeigten diese sogenannten Toxolecithide gegenüber Chloroform, Äther und Wasser eine veränderte Löslichkeit, die sich zwischen der des Toxins und der des Lecithins hielt, so daß die Annahme einer Komplexbildung zwischen Lecithin und Toxin begründet schien. Allerdings konnte *I. Bang* (56) das Toxolecithid mit eigens dazu gereinigtem Lecithin nicht reproduzieren. *E. Reiss* (57) fand, daß Trypsin und Lab sich in Gegenwart von Lecithin in Chloroform lösen; dasselbe Verhalten zeigte nach *L. Michaelis* und *P. Rona* (58) das Lab; unter Mitwirkung von Lecithin sind Albumosen in Alkohol-Chloroform löslich. *H. Handovsky* und *R. Wagner* (59) konnten Globuline mit 1,5proz. Lecithinlösungen fällen, nicht aber Albumine. Durch Salze wird die Fällung gehemmt. Nach diesen Autoren bildet das Lecithin mit den Globulinen, nicht aber mit den Albuminen Komplexe.

Es ergibt sich somit ganz allgemein, daß das Lecithin eine besondere Affinität zu Eiweiß und verwandten Körpern besitzt, die sich durch eine Löslichkeitserhöhung des Eiweißes kundtut. *K. Frankenthal* (60) hat vor kurzem gezeigt, daß die Euglobulinfraktion (dargestellt durch $^1/_3$ $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung oder durch Elektrodialyse) des Pferdes 71,7 Proz. der gesamten Serumlipoide enthält, und unsere Versuche zeigen, daß das Lecithin gerade die Euglobuline gegen die $(NH_4)_2SO_4$-Aussalzung zu schützen vermag.

Falls die spezifische Refraktion des Eiweißes durch Lecithin nicht verändert wird, so spricht dies nicht gegen eine Komplexbildung zwischen Lecithin und Eiweiß, wird aber die spezifische Refraktion des Eiweißes durch Lecithinzusatz geändert, so ist dies nach dem oben Gesagten für eine Komplexbildung Lipoid-Eiweiß beweisend. Die spezifische Refraktion des reinen Globulins war vor dem Lecithinzusatz $104 \cdot 10^{-5}$, nach dem Lecithinzusatz $72 \cdot 10^{-5}$. Damit *ist eine Komplexbildung in vitro zwischen Serumeiweiß und Lecithin erwiesen.* Dieser Komplex besitzt eine geringere Polarisierbarkeit und wird schwerer ausgesalzen. Unsere Versuche sind für die Immunitätslehre, speziell für die Frage nach der Konstitution des heterogenetischen

Antigens von Bedeutung. Bekanntlich versteht man unter homologen Antikörpern solche, die nur auf die ursprüngliche Immunisierungsflüssigkeit einwirken. Diese Reaktionen bilden die Grundlage der klassischen Immunitätslehre. Im Jahre 1911 gelang es *J. Forssman* (61), heterologe Antikörper, d. h. solche Antikörper herzustellen, die auf gewisse Sera spezifisch wirken, die aber bei der Bildung der Antikörper selbst nicht beteiligt waren, indem er wässerige Meerschweinchenorganemulsionen Kaninchen injizierte, worauf die Kaninchen Hämolysine bildeten, die Schaferythrocyten ebenso intensiv auflösten, wie die durch Schafblutinjektionen erzeugten homologen Antikörper.

Durch die Untersuchungen von *J. Forssman* (61), *R. Doerr* und *R. Pick* (62) und *F. Schiff* ergab sich folgende interessante, charakteristische Lokalisation des heterogenetischen Antigens:

1. Es kommt vor in den Organen vom Meerschweinchen, Pferd, Huhn, Katze, Schildkröte, in geringen Mengen auch im Serum dieser Tiere, fehlt aber völlig in ihren Erythrocyten.
2. Es kommt vor in den Erythrocyten von Hammel und Ziege.
3. Es fehlt völlig im Rinde, Kaninchen, Ratte, Schwein, Menschen, Gans, Taube, Maus, Aal und Frosch.

Schon im Jahre 1914 wurde die Frage nach der chemischen Konstitution des heterogenetischen Antigens durch *R. Doerr* und *R. Pick* (64) aufgerollt, die neueren Untersuchungen von *K. Landsteiner* (65) und *K. Landsteiner* und *S. Simms* (66) und *N. Takenomata* (67) brachten eine gewisse Klärung, so daß man an eine physikalisch-chemische Untersuchung denken konnte.

K. Landsteiner zeigte:

1. Alkoholische Extrakte aus Pferdeniere bewirken in vitro noch Hämolyse, vermögen, aber für sich allein Kaninchen injiziert, keine Antikörper zu erzeugen, mit anderen Worten, die Alkoholextrakte haben keine Antigenfunktion, binden aber in vitro noch spezifisch (Haptene).
2. Fügte *Landsteiner* zu alkoholischem Pferdenierenextrakt Schweine- oder Menschenserum, so trat die heterogenetische Antikörperbildung im Kaninchen wieder auf. Injizierte er beide Komponenten getrennt, so war die Antikörperbildung schwächer, während die Komponenten allein unwirksam waren.

K. Landsteiner vermutet auf Grund dieser Experimente, daß das heterogenetische Antigen aus einem Komplex von Eiweiß und locker gebundenem Lipoid bestehe, das durch Alkohol leicht abgespalten werde. *Unsere Versuche beweisen, daß durch Zusatz von Lecithin zu Serum ein Lecithin-Eiweißkomplex gebildet wird.*

Das Verhalten der Komponenten des heterogenetischen Antigens ist in neuerer Zeit noch weiter untersucht worden: *K. Landsteiner*

und *S. Simms* (66) zeigten, daß auch dem Hapten ein minimales Immunisierungsvermögen zukomme; *H. Sachs* und *A. Klopstock* (68) erreichten auf Lecithin und Cholesterin spezifische Antikörperbildung. Andererseits ergaben die Untersuchungen von *F. Georgi* (69) und *F. Heimann* (70), daß die Qualität der zugesetzten Eiweißkomponente von Bedeutung ist, indem sich Pferdeserum weniger eignet als Schweineserum, *R. Doerr* und *C. Hallauer* (71) aber gelang es nicht nur, Schweine-, Pferde- und Menschenserum, sondern auch Rinderserum, Typhusbazillenextrakte, mit Extrakten von Erythrocyten, der Leber und der Niere des Kaninchens als Eiweißkomponente bei der heterologen Antikörpererzeugung zu verwenden. Sie glauben deshalb, daß der Dispersitätsgrad der Eiweißkomponente für die heterologe Antikörperbildung ein ausschlaggebender Faktor ist. Vom physikalisch-chemischen Standpunkt aus läßt sich über Rolle und Grad der Dispersion des Eiweißes und eventuell auch des Lipoids, die für eine Komplexbildung ein Optimum darstellen, nichts mit Bestimmtheit sagen. Weitere Literatur bei *Landsteiner* und *Simms*; Beziehungen zur Anaphylaxie bei *Doerr* und eventuelle Beziehungen zur Wassermannreaktion bei *Sachs*.

B. Die Individualität der Albumine und Globuline.

I. Die Aussalzung[1]).

Die klassische Methode, Eiweißkörper aus ihren Lösungen zu isolieren, ist die Aussalzung. Schon *Panum*, *W. Kühne* und *Alexander Schmidt* hatten die Aussalzbarkeit der Serumeiweißkörper festgestellt. Von *Th. Weyl* stammt der Begriff des Serumglobulins. *O. Hammarsten* nannte alle jene Eiweißkörper, die durch Magnesiumsulfatganzsättigung ausgesalzen werden, Globuline. Das war aber nicht die einzige Definition, die damals existierte; auch jene Eiweißkörper, die durch Dialyse der Salze unlöslich wurden, hießen Globuline; das *Weyl*sche Globulin aber war jener Eiweißkörper, der beim Verdünnen von Blutserum mit 15 Volumteilen Wasser, nach Ansäuern mit Essigsäure und gleichzeitigem Durchleiten von Kohlensäure ausgeschieden wurde.

Erst die grundlegende Arbeit von *G. Kauder* im Jahre 1886, einem Schüler von *Franz Hofmeister*, brachte eine gewisse Abklärung in das damals viel, aber uneinheitlich bearbeitete Gebiet. *G. Kauder* zeigte:

1. daß die Aussalzung von der Art des Salzes abhängig ist;
2. daß die Aussalzung die Eiweißkörper nicht verändert.

Wollte man also zu einer experimentell vergleichbaren Basis gelangen, so mußte man sich zunächst auf ein bestimmtes Salz als Aussalzungsmittel einigen und so nach Übereinkunft rein definitionsgemäß die Nomenklatur festlegen. Dies geschah um so leichter, als *G. Kauder*

[1]) Literatur bei (10).

gleichzeitig die etwas umständliche $MgSO_4$-Fällung durch die elegante und sichere $(NH_4)_2SO_4$-Fällung nach *Méhu* ersetzte.

Man *definierte* nach *G. Kauder*, und diese Definition ist auch heute noch die einzig richtige: Diejenigen Eiweißkörper, die aus *nativem* Serum durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat ausgesalzen werden, wollen wir *Globuline* nennen, und diejenigen Eiweißkörper, die zwischen Halb- und Ganz-$(NH_4)_2SO_4$-Sättigung ausgesalzen werden, *Albumine*. *Globulin und Albumin sind also konventionell, definitionsgemäß festgelegte Begriffe.* Die Grenze $(NH_4)_2SO_4$-Ganz-Sättigung war dadurch gegeben, daß bei dieser Konzentration alles Eiweiß quantitativ ausgesalzen wurde, aber welchen Sinn hatte es, den Einschnitt gerade bei Halbsättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ zu machen? A priori lag hierfür kein Grund vor, praktisch vielleicht der, daß man sich damit etwas an den von *Hammarsten* durch $MgSO_4$-Ganzsättigung ausgesalzenen Körper anlehnte. Allerdings machte bereits *E. P. Pick* (25) und neuerdings wieder *P. Rusczynski* (80) darauf aufmerksam, daß die Fällungsgrenzen von Globulin und Albumin auseinander liegen, so daß zwischen den einzelnen Fällungsgrenzen Konzentrationsintervalle liegen, in denen nichts aussalzt; aber wie sollte man sich zu dem Eiweiß stellen, das bei $^1/_3$-, $^2/_5$-, $^4/_5$- oder bei irgend einer beliebigen $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung ausgesalzen wird? *A. E. Burckhardt* und *E. Marcus* vertraten schon zu ihrer Zeit die Anschauung, daß das Globulin nichts Einheitliches sei, und in der Tat: *K. Spiro* zusammen mit *B. Haake*, *E. Fuld* und *E. P. Pick* zerlegten die Globulinfraktion in die bei $^1/_3$-$(NH_4)_2SO_4$-Sättigung ausfallenden sogenannten Euglobuline und in die zwischen 33 bis 46 Proz. $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung ausfallenden sogenannten Pseudoglobuline. 1902 teilten *O. Porges* und *K. Spiro* die Globuline in drei Fraktionen, und *E. Freund* und *J. Joachim* kamen sogar zu einer Vierteilung der Globuline, und 1922 brachten schließlich noch *R. Doerr* und *W. Berger* (73) eine Fraktionierung der Albumine. Kein Wunder, daß *E. Herzfeld* und *R. Klinger* (74) (75) (76) schon 1917 die Eigenschaften der Albumine, Eu- und Pseudoglobuline usw. nur als Äußerungen des verschiedenen Dispersitätsgrades ein und desselben Bluteiweißkörpers aufgefaßt haben wollten, und der schematisierende kolloidchemische Zug in Biologie und Medizin kam dieser Hypothese damals sehr zustatten.

Die klassische Definition der Albumine und Globuline steht und fällt mit dem Wesen der Aussalzung. Bekanntlich haben *F. Hofmeister*, *Pauli*, *Washburn*, *Höber* u. a. die Anschauung entwickelt, daß die Aussalzung auf einer Dehydratation des auszusalzenden Stoffes beruhe, indem die Salze mit dem auszusalzenden Stoffe um das Lösungsmittel konkurrieren. Wie *J. Loeb*, *P. E. Howe* u. a. gezeigt haben, deckt sich aber diese Hypothese mit vielen Tatsachen nicht.

In neuerer Zeit hat *E. A. Hafner* mit *L. v. Kürthy* (49) (77) (78) eine Theorie entwickelt, die geeignet erscheint, die tatsächlichen Verhältnisse zu erfassen. Für die Aussalzung ist wesentlich, daß eine große Menge Ionen, also eine große Elektrizitätsmenge in die wässerige Lösung eines Nichtelektrolyten eingetragen wird. In der Nachbarschaft eines jeden Ions bestehen starke, elektrische Felder, wodurch die Umgebung, Lösungsmittel und gelöster Stoff, polarisiert werden, wofür gilt

$$\bar{P} = \bar{\mathfrak{E}} \frac{D-1}{4\pi}.$$

es ist $\bar{P}$ = Polarisation,
$\bar{\mathfrak{E}}$ = elektrische Feldstärke,
D = Dielektrizitätskonstante,
π = 3,14 . . .

Für ein gegebenes Feld hängt nun die relative Translation von Gelöstem und Lösungsmittel von ihrer *relativen Polarisierbarkeit* ab. Meist liegen die Verhältnisse so, daß der Nichtelektrolyt eine kleine D. K. und damit eine geringere Polarisierbarkeit hat als das Lösungsmittel, und diese Moleküle bewegen sich im elektrischen Felde zwangsläufig nach Orten geringster Feldstärke, wo es zur Anhäufung der Teilchen kommt, die bis zur Zweiphasenbildung und damit zur Aussalzung fortschreiten kann. Der zweite Faktor ist die Stärke des polarisierenden Feldes oder, mit anderen Worten, die *relative Aktivität des Einzelions*, die den Aussalzungseffekt bestimmt. Die Theorie haben später *P. Debye* und *J. Mc Aulay* (79) quantitativ ausgearbeitet.

Bei der Aussalzung der Eiweißkörper aus *nativen* Sera kommt somit als wesentlich in Betracht:

1. Das Lösungsmittel hat im großen und ganzen immer dieselbe Polarisierbarkeit.

2. Wenn immer nur dasselbe Salz, $(NH_4)_2SO_4$, verwendet wird, so ist für eine festgelegte Konzentration die relative Aktivität der aussalzenden Ionen immer dieselbe.

3. Es ist kürzlich darauf hingewiesen worden (78), daß die Polarisierbarkeit konstitutionschemisch bedingt ist, indem auch gilt:

$$P = \frac{3}{4\pi} \frac{M}{d} \frac{n^2-1}{n^2+2},$$

wobei n = Brechungsquotient,
M = Molekulargewicht,
d = Dichte,
π = 3,14, . . .
P = Polarisation.

Hieraus folgt streng: Die Aussalzung ***kann*** zu einer Differenzierung von strukturchemisch unter sich zusammengehörenden Eiweißgruppen führen. Da es sich aber hierbei um ***die relative Polarisierbarkeit*** zwischen Eiweiß und Dispersionsmittel handelt, hat die Differenzierung bzw. die Definition der Albumine und Globuline durch die $(NH_4)_2SO_4$-Aussalzung ***nur Sinn in bezug auf natives Serum.*** Ob aber die Aussalzung im Einzelfall zu einer *genügenden* Differenzierung jeweils führt, kann nicht a priori, sondern nur durch die sorgfältige, unvoreingenommene Analyse der ausgesalzenen Produkte entschieden werden.

II. Die Charakterisierung der ausgesalzenen Körper.

a) Chemisch.

Wir *definieren* und *identifizieren* Albumine und Globuline durch ihre Aussalzbarkeit. Diese Sackgasse hat immer wieder zu Unklarheiten und unzutreffenden Interpretationen geführt. Es soll nun deshalb kurz im Zusammenhang untersucht werden, ob und inwieweit die oben besprochene Aussalzung zu chemisch charakterisierten Eiweißkörpern führt.

K. H. Mörner (81) hat gefunden, daß die Albumine sehr schwefelreich sind und bis 1,6 — 2,2 Proz. S enthalten, während die Globuline des Blutserums nur 1,02 — 1,11 Proz. S enthalten. In der Bruttozusammensetzung unterscheiden sich die Eiweißkörper von anderen organischen Körpern durch ihren N-Gehalt. Man hat daher auf die N-Analyse besonderen Wert zu legen. Unterwirft man die beiden Hauptfraktionen des Serums unter genau denselben Bedingungen der Säurehydrolyse, so liefern die Globuline, wie *K. Spiro* (82) u. A. nachgewiesen haben, etwa 3½ Proz. Glykokoll, während die Albumine kein Glykokoll enthalten. Eine sehr sorgfältige Analyse hat *Hartley* (83) ausgeführt (Tabelle XVIII).

Tabelle XVIII.

	Gesamt-Globulin Proz.	Gesamt-Albumin Proz.
Ammonium-N	7,7	5,8
Melanin-N	2,0	1,1
Cystin-N	2,0	3,5
Arginin-N	10,9	10,4
Histidin-N	6,3	6,7
Lysin-N	9,0	16,3
Gesamt-Basen-N	28,2	36,9
Gesamt-Filtrat-N	62,0	56,5
Amino-Filtrat-N	59,5	54,2
Nicht-Amino-N	2,2	2,3

F. Obermeyer und *R. Willheim* (34) (35) haben den formoltitrierbaren N der Albumine und Globuline bestimmt und nennen das Verhältnis Gesamt-N : Formoltitrierbarer N den Aminoindex x. Der Aminoindex der Albumine beträgt 14 — 10, der der Globuline 23 — 18, mit anderen Worten, die Zahl der endständigen Aminogruppen im Albumin ist viel größer als im Globulin. Im vorigen Jahre hat *F. Lieben* (84) Untersuchungen über die Nitrierung der Albumine und Globuline mitgeteilt und gefunden, daß die Albumine und Globuline entsprechend ihrem verschiedenen Tryptophangehalt verschieden nitrierbar sind, indem Globulin ungefähr um 100 Proz. tryptophanreicher als Albumin ist (85).

Diese chemischen Untersuchungen zeigen zur Evidenz, daß, wenn auch die Aussalzung nicht zu völlig exakt chemisch definierbaren Körpern führt, die durch Ammoniumsulfathalbsättigung aus nativem Serum ausgefällten *Globuline sich in ihrer chemischen Zusammensetzung fundamental von den Albuminen unterscheiden*, so daß von irgend einer chemischen Identität auch nicht im geringsten die Rede sein kann.

b) Physikalisch-chemisch.

Es ist ganz klar, daß für die Frage der Individualität der Albumine und Globuline nur solche physikalisch-chemischen Eigenschaften entscheidend sind, die dispersitätsinvariabel und strukturchemisch interpretierbar sind.

Kürzlich hat *E. A. Hafner* (86) an isoelektrischem, salzfreiem Albumin und Globulin, also unter physikalisch streng vergleichbaren Bedingungen gezeigt, daß die durch $(NH_4)_2SO_4$-Halbsättigung ausgesalzenen Eiweißkörper von denen zwischen Halb- und Ganzsättigung aussalzbaren Körpern aus demselben Blutserum sich nicht nur wesentlich durch ihre spezifische Rotation unterscheiden, sondern auch durch die Rotationsdispersion. Diese beträgt für das Globulin 78,5°, für das Albumin 66,5 Proz. Damit konnte wohl zum erstenmal auf diesem Wege gezeigt werden, daß die Globuline und die Albumine strukturchemisch verschiedene Körper darstellen. Die Analyse der Rotationsdispersionskurve beider Serumeiweißkörper führt zu der Vorstellung, daß die Albumine und Globuline einen beinahe identischen Kernoszillatorenkomplex von hoher Frequenz besitzen, sich aber durch verschiedene Nebenoszillatorenkomplexe geringerer Frequenz unterscheiden. Diese Vorstellung verdient vielleicht ein gewisses Interesse, da auch *Max Bergmann* (87) (88) auf rein chemischem Wege zu verwandten Anschauungen geführt wurde. Auch die röntgenspektrographischen Untersuchungen von *R. O. Herzog* und *H. W. Gonell* (89) (90) sprechen in demselben Sinne, und *F. Umber* (91) wies schon 1898 in einer bei *F. Hofmeister* gefertigten Arbeit auf die „*nahe Verwandtschaft*

der Mutterkomplexe in den verschiedenen Proteinstoffen, deren spezifische Eigentümlichkeiten vielleicht nur durch die Anwesenheit besonderer, dem Molekül angelagerter Gruppen bedingt sind".

Wenn zwei Körper eine verschiedene Refraktion haben, so sind sie chemisch sicher verschieden. Dieser Satz ist nicht umkehrbar. Körper gleicher Refraktion können chemisch verschiedene Individuen sein (Tabelle XIX).

Tabelle XIX.

Stoff	*n*
$CaSO_4$	1,5696
Isosafrol	1,5693
Antipyrin	1,5697

A. Bélak (92) hat ausführlich gezeigt, wie durch Säuren usw. die Ionisation, die Hydratation und der Dispersitätsgrad des Globulins geändert wird. *T. B. Robertson* (vgl. Tabelle XI) und wir selbst konnten nachweisen, daß die spezifische Refraktion durch die p_H nicht verändert wird. Dasselbe gilt von der Salzwirkung, so daß die spezifische Refraktion weitgehend dispersitätsinvariabel ist. *T. B. Robertson* (4) ist es auch gelungen, verschiedene Eiweißstoffe durch ihre spezifische Refraktion zu charakterisieren (Tabelle XX).

Tabelle XX.

Eiweiß	Spez. Refraktion	Eiweiß	Spez. Refraktion
Ovovitellin	0,001 30	Paranuclein . . .	0,001 40
Casein	0,001 52	*Serumglobulin* . .	**0,002 29**
Ovomucoid	0,001 60	*Serumalbumin* . .	**0,001 77**

Wir haben in dieser Arbeit gezeigt, daß die spezifische Refraktion der Serumeiweißkörper starken Schwankungen unterliegt, und die Gründe hierfür auseinandergesetzt. Es ist aber wichtig zu betonen, daß in ein und demselben Serum in der Mehrzahl der Fälle die *spezifische Refraktion des Albumins und des Globulins außerhalb aller Fehlergrenzen verschieden ist.*

Ch. Dhéré (136) hat ferner gezeigt, daß sich das Serumglobulin durch seine Absorptionsbanden im Ultravioletten vom Serumalbumin wesentlich unterscheidet.

Wenn auch alle diese Größen nicht absolut vom Dispersitätsgrad unabhängig sind, so führen auch diese physiko-chemischen Messungen übereinstimmend zu einem mit den chemischen Untersuchungen vollständig konformen Resultat.

c) Biochemisch.

Die Eiweißstoffe sind hochkomplexe Gebilde, und je nach dem Wege, über den sie abgebaut werden, gelangt man zu verschiedenen chemischen Individuen. So konnte in neuerer Zeit durch *M. Bergmann* (87) (88), *E. Abderhalden* u. A. die Möglichkeit erwiesen werden, daß am Aufbau der Proteine auch isomerisierte Diketopiperazine teilhaben. Die durch die Arbeiten von *E. Fischer* und *Fr. Hofmeister* begründete Anschauung vom Peptidaufbau der Proteine hat dadurch eine wichtige Ergänzung und Erweiterung erfahren. Jene klassische Anschauung hatte eine ihrer Stützen in den Abbauprodukten, die beim fermentativen Abbau der Proteine entstehen. *F. Umber* (91) hat dabei gezeigt, daß die Spaltung von Serumglobulin durch Pepsin in Albumosen und Peptone viel langsamer und schwerer vor sich geht als die peptische Spaltung von Albumin. *E. Fischer* und *E. Abderhalden* (92) fanden bei Serumglobulin gegenüber Pankreatin eine höhere Resistenz als bei Serumalbumin, und *C. Oppenheimer* und *H. Aron* (93) zeigten speziell, daß die höhere Resistenz des Globulins gegen Trypsin auch bei Ausschluß eines Antitrypsins bestehen bleibt.

Zweifellos ist für die fermentative Spaltbarkeit der Dispersitätsgrad des Substrats von Bedeutung. Nun ist aber bei p_H 2,2, dem Optimum der Pepsinwirkung, der Dispersitätsgrad zwischen Albumin und Globulin infolge der allgemeinen Säurequellung kaum wesentlich verschieden, und berücksichtigt man die im Verhältnis zu den Carbohydrasen sehr geringe Spezifität der Proteasen, so ist die erhöhte Resistenz des Globulins gewiß sehr bemerkenswert und spricht für sich allein bis zu einem gewissen Grade zugunsten konstitutionschemischer Differenzen beider Eiweißkörper.

d) Immunologisch und biologisch.

1911 gelang es *J. Bauer* und *St. Engel* (113), Albumin und Globulin durch den Komplementbindungsversuch exakt zu trennen.

H. H. Dale und *P. Hartley* (94) haben am Uterus des Meerschweinchens gezeigt, daß Euglobulin, Pseudoglobulin und Albumin anaphylaktische Antigene sind, und *die Sensibilität, die sie erzeugen, ist spezifisch für die einzelnen Fraktionen*, so daß z. B. ein mit Euglobulin sensibilisiertes Tier auf Einverleibung von Albuminen keine anaphylaktischen Symptome zeigt. Dabei hat sich nun herausgestellt, daß sich die Empfindlichkeit bei Einverleibung der Albumosen sehr viel später entwickelt als bei den Globulinen. *R. Doerr* und *W. Berger* (73) (95) (96) fanden, daß sich die Albumine und Globuline in ihrer anaphylaktogenen Wirksamkeit auch quantitativ beträchtlich unterscheiden, indem für die Globuline die Latenzperiode kürzer, die

minimal sensibilisierende Dosis enorm viel kleiner (1 : 200) und die schockauslösende Kraft größer ist als für die Albumine. Und weiter, für eine erhebliche Differenz spricht, daß im anaphylaktischen Konkurrenzversuch (crossed desensitisation) das Euglobulin das Albumin verdrängt, nicht aber umgekehrt.

H. Chick (97) glaubt, daß die Pseudoglobuline mit den Lipoiden reagieren und so ein Lipoid-Eiweißkomplex, das Euglobulin, entsteht. Wir haben in der vorliegenden Arbeit die Beziehungen zwischen Eiweiß und Lipoiden eingehend erörtert, und es muß zum mindesten die Frage aufgeworfen werden, inwieweit die beobachteten immunologischen Differenzen zwischen Albumin und Globulin nicht auf den verschiedenen Lipoidanteil (60) der Serumfraktionen zurückzuführen sind. Bis heute ist diese Möglichkeit experimentell nicht ausgeschlossen worden. Dasselbe gilt auch für das von *A. Schürmeyer* (98) beobachtete entgegengesetzte Verhalten von Albumin und Globulin auf die Beeinflußbarkeit der Inversionskonstante durch Ionen. Die Individualität des Globulins und Albumins wird aber dadurch in keiner Art und Weise in Frage gestellt, da die besondere Affinität des Lecithins zum Euglobulin, seine spezifische Schutzwirkung gegen die $(NH_4)_2SO_4$-Aussalzung eine, wie wir oben gezeigt haben, komplexchemisch bedingte Wirkung ist. Damit steht auch in Zusammenhang, daß die Goldzahl des Globulins nach den Untersuchungen von *Fr. N. Schulz* und *R. Zsigmondy* (99), *F. Jacobs* (100), *W. Heubner* und *F. Jacobs* (101) und von *J. Reitstötter* (102) kleiner als die des Albumins und ihre Schutzwirkung dementsprechend größer ist. So hat z. B. Pferdealbumin (102) eine Goldzahl von 0,0741 (reziproke Goldzahl = 15) und das Globulin eine solche von 0,0239 (reziproke Goldzahl = 41). Neuerdings glaubt *R. Zsigmondy* (103), daß zum Verständnis der Schutzwirkung das Verhältnis V = Zahl der Goldteilchen : Zahl der Schutzkolloidteilchen genüge. Für einen gewissen Typus der Schutzwirkung trifft dies zweifellos zu; aber gerade für den Fall der Albumine und Globuline versagt diese Betrachtung: Es ist eine feststehende Tatsache, daß die Globuline einen geringeren Dispersitätsgrad als die Albumine haben. Vergleicht man nun gleiche Massen Albumin und Globulin auf ihre schützende Wirkung, so müßte, wenn V allein maßgebend wäre, Albumin eine bessere Schutzwirkung entfalten als Globulin. Die Erfahrung zeigt, daß das Gegenteil der Fall ist. Um die Frage nach der Natur der bei der Schutzwirkung und verwandten Erscheinungen wirksamen Kräfte kommen wir nicht herum, und es hat sich immer deutlicher herausgestellt, daß die rein mechanische Adsorption, wie sie *A. Eucken* (105) (107) und *M. Polányi* (104) (106) behandelt haben, ein Idealfall, ein Grenzfall ist, der relativ selten realisiert ist. In der Mehrzahl der Fälle spielen spezifische Kräfte chemischer Natur, wie sie im Gebiete der Komplex-

chemie schon lange bekannt sind, die entscheidende Rolle. *J. Langmuir* (108) (109) hat schon vor 8 Jahren die chemische Natur der Adsorption betont und die Inadäquatheit zwischen rein mechanischer Auffassung und Beobachtung aufgezeigt.

Im Gegensatz zur Goldzahl ist die Verschiedenheit der Eisenzahl (110), die etwas ganz anderes bedeutet, und auch die der Rubinzahl, wie aus den neueren Untersuchungen von *St. Bächer* (111) und *G. Ettisch* und *H. Runge* (112) hervorgeht, nicht der Ausdruck verschiedener Konstitution, sondern der verschiedenen Ladungsverhältnisse der Albumine und Globuline.

Es ist eine alte Erfahrungstatsache, daß unter gewissen Bedingungen im Blute charakteristische Eiweißverschiebungen auftreten. So beobachtete schon *Panum* vor 70 Jahren, daß während der Schwangerschaft die Globuline vermehrt sind. *G. v. Bunge* berichtet in seinem Lehrbuch, daß bei hungernden Schlangen die Albumine aus dem Blute verschwinden. *A. E. Burckhardt* (114) und *Th. St. Githens* (115) studierten die Globulinvermehrung im Hunger bei Hunden. *L. Moll* (116) erzielte nach Eiweißinjektionen, *G. C. Reymann* (117) nach Manganchloridinjektionen Globulinsteigerung. *P. Morawitz* (118) beobachtete nach starken Blutverlusten, daß zuerst die Albumine zunehmen, die Globuline absolut konstant bleiben. Nach ungefähr 3 Stunden erreichen die Albumine eine gewisse Konstanz, und nun setzt ein rapides Ansteigen der Globuline ein. Auch auf Einverleibung von Antipyretica antwortet der Organismus mit einer Globulinsteigerung [*F. Cervallo* (119), *F. Breinl* (120)], ebenso bei Infektionen [*L. Langstein* und *M. Mayer* (121)], und wie in sehr vielen Arbeiten untersucht worden ist, tritt auch im Laufe von gewissen Immunisierungsprozessen (Diphtherie, Cholera usw.) eine Globulinvermehrung auf [*W. Seng* (122), *J. P. Atkinson* (123), *Ph. H. Hiss* und *J. P. Atkinson* (124), *R. B. Gibson* und *A. E. Banzhaf* (125), *S. H. Hurwik* und *K. F. Meyer* (126), *G. C. Reymann* (127), *St. Bächer* und *M. M. Kosian* (128) u. a.].

Der relative Globulinspiegel ist bei den verschiedenen Tierarten verschieden [*J. H. Woolsey* (129)], beim Menschen schwankt er normal schon sehr stark und wird durch das Höhenklima verändert [*H. C. Frenkel-Tissot* (130)]. Einen prägnanten Einfluß von Alter und Ernährung konnte *C. E. Wells* (131) nicht finden. *E. A. Hafner* (10), *P. E. Howe* und *E. S. Sanderson* (132) untersuchten die Veränderungen des Globulinspiegels während der Schwangerschaft.

Es sind viele Vermutungen über die Bedeutung dieser Globulinveränderungen geäußert worden; man dachte an kausale Beziehungen zum Fieber, zur Antikörperproduktion, zum Blutzerfall, zu Knochenmarksreizungen usw. Sicher ist nur:

1. *Die Verschiebung des Globulinspiegels ist eine ganz allgemeine und häufige Reaktion des Organismus auf ganz verschiedene Einflüsse*, ähnlich der reaktiven Temperatursteigerung.

2. *Über die biologische Bedeutung dieser Reaktion wissen wir nichts.*

3. Es ist mit Sicherheit festgestellt worden (132), daß *die einzelnen Serumfraktionen völlig unabhängig voneinander* und ohne Zusammenhang *im Organismus vermehrt oder vermindert werden.*

Dieses spricht auch im biologischen Sinne für die Individualität der Serumeiweißfraktionen, und die Annahme einer gegenseitigen Umwandlung innerhalb der Blutbahn ist mit diesen Beobachtungen unvereinbar. In diesem Zusammenhang sei auch an die interessante Beobachtung von *A. Carrel* und *H. A. Ebeling* (133) erinnert, die fanden, daß natives Globulin junger Hühner die proliferative Tätigkeit homologer Fibroblasten fördert, das Albumin aber hemmt.

Zusammenfassend ergibt sich, daß auch *immunologisch und biologisch die Globuline und die Albumine völlig differente, gegenseitig nicht ersetzbare Eiweißkörper sind.*

C. Literatur.

1) *E. Reiss*, Der Brechungskoeffizient der Eiweißkörper des Blutserums. Hofmeisters Beitr. **4**, 150, 1904. — 2) *Derselbe*, Die refraktometrische Blutuntersuchung und ihre Ergebnisse für die Physiologie und Pathologie des Menschen. Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **10**, 531, 1913. — 3) *Derselbe*, Refraktometrische Blutuntersuchungen. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod., Abt. IV, Teil 3, S. 299, 1923. — 4) *T. B. Robertson*, On the refractive indices of solutions of certain proteins. Journ. of biol. Chem. **7**, 359, 1909.; **8**, 287, 441, 507, 1910; **9**, 181, 1911; **11**, 179, 1912. — 5) *Derselbe*, A micro-refractometric method of determining the percentages of globulin and albumin in very small quantities of blood serum. Ebendaselbst **22**, 233, 1915. — 6) *F. Rohrer*, Bestimmung des Mischungsverhältnisses von Albumin und Globulin im Blutserum. Deutsch. Arch. f. klin. Med. **121**, 221, 1916. — 7) *Derselbe*, Refraktometrische und viskosimetrische Untersuchungen am Blutserum. Schweiz. med. Wochenschrift **52**, 555, 789, 1922. — 8) *W. Berger* und *L. Petschacher*, Vergleichende Untersuchungen zur Mikroeiweißanalyse des Blutserums. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **36**, 258, 1923. — 9) *B. S. Neuhausen* und *D. M. Rioch*, The refractometric determination of serum-proteins. Journ. of biol. Chem. **55**, 353, 1923. — 10) *E. A. Hafner*, Über den Albumin- und Globulinkoeffizienten, besonders während der Schwangerschaft. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **101**, 335, 1924. — 11) *W. Starlinger* und *K. Hartl*, Über die Methodik der quantitativen Bestimmung der Eiweißkörpergruppen des menschlichen Blutserums. Diese Zeitschr. **160**, 113, 129, 147, 1925. — 12) *B. Chalier* et *Chevalier*, Sur les relations entre l'indice de réfraction, la viscosité et la teneur du sérum sanguin en albumines. C. r. **93**, 173, 1925. — 13) *L. Beltz* und *E. Kaufmann*, Über die Bestimmung von Brechungsindex und Eiweißprozentgehalt des Blutserums mittels des Interferometers. Zeitschr. f. klin. Med. **100**, 409, 1925. — 14) *Böhme*, l. c. nach 2). — 15) *L. Cikanek*, *J. Havlik* und *F. Kubanek*,

Studium der Eiweißkörperkoagulation im Tropfen. IV. Mitteilung. Diese Zeitschr. **145**, 98, 1924. — 16) *I. Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung, 1922. — 17) *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 1923. — 18) *Parnas* und *Heller*, Über den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute. Diese Zeitschr. **152**, 1, 1924. — 19) *O. Folin* und *H. Wu*, A system of blood analysis, Journ. of biol. Chem. **38**, 86, 1919. — 20) *O. Folin*, Note on the necessity of dchecking up the quality of sodium tungstale used in the system of blood analysis. Ebendaselbst **51**, 419, 1922. — 21) *G. Kauder*, Zur Kenntnis der Eiweißkörper des Blutserums. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **16**, 322, 1883. — 22) *C. Porges* und *K. Spiro*, Die Globuline des Blutserums. Hofmeisters Beitr. **3**, 276, 1902. — 23) *P. E. Howe*, The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. Journ. of biol. Chem. **49**, 93, 1921. — 24) *Derselbe*, The determination of proteins in blood. A micromethod. Ebendaselbst **49**, 109, 115, 1921. — 25) *E. P. Pick*, Untersuchungen über die Proteinstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 246, 1898. — 26) *K. Samson*, Ein Beitrag zur Kenntnis der Serumglobuline des Menschen. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **41**, 211, 1924. — 27) *F. Löwe*, Optische Messungen des Chemikers und des Mediziners, 1925. — 28) *E. A. Hafner*, Der Kolloidzustand des Euglobulins als Funktion des Dispersionsmittels. Klin. Wochenschr. **4**, 802, 1925. — 29) *P. Rona* und *H. Petow*, Beitrag zur Frage der Ionenverteilung im Blutserum. Diese Zeitschr. **137**, 356, 1923. — 30) *G. Giemsa*, Über einen einfachen und wirksamen Laboratoriumsapparat zur Ultrafiltration proteinhaltiger Sole. Ebendaselbst **132**, 488, 1922. — 31) *K. Asada*, Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Zellsalze auf Eiweißstoffwechsel, Gaswechsel und Körpergewicht. Diese Zeitschr. **140**, 326, 1923. — 32) *K. Tadenuma*, Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Zellsalze auf den intermediären Stoffwechsel der organischen Substanz. Ebendaselbst **145**, 480, 1924. — 33) *R. Peter*, Über die Corneagröße und ihre Vererbung. Graefes Arch. f. Ophthalmologie, 1924. — 34) *F. Obermeyer* und *R. Willheim*. Über formoltitrimetrische Untersuchungen an Eiweißkörpern. Diese Zeitschr. **38**, 331, 1912. — 35) *Dieselben*, Über formoltitrimetrische Untersuchungen an Eiweißkörpern. Ebendaselbst **50**, 369, 1913. — 36) *H. Handovsky*, Beiträge zur Aufklärung der Struktur des Blutes. Kolloid-Zeitschr. **36**, 292, 1925. — 37) *R. R. Henley*, Changes in the proteins and the gelatification of formalized blood serum. Journ. of biol. Chem. **57**, 139, 1923. — 38) *H. Kürten*, Formaldehyd und Eiweißquotient. Diese Zeitschr. **135**, 536, 1922. — 39) *E. Adler* und *L. Strauss*, Beitrag zum Mechanismus der Bilirubinreaktion im Blut. Klin. Wochenschr. **2**, 932, 1923. — 40) *E. Adler* und *L. Strauss*, Beitrag zum Mechanismus der Bilirubinreaktion im Blut. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **44**, 1, 1924; speziell S. 60. — 41) *R. B. Gibson*, On the nature of the so-called artificial globulin. Journ. of biol. Chem. **12**, 61, 1912. — 42) *G. Fanconi*, Zur Frage des sogenannten künstlichen Globulins. Diese Zeitschr. **139**, 321, 1923. — 43) *L. Petschacher*, Veränderungen des Kolloidzustandes der Serumeiweißkörper unter physikalischen Einflüssen. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **47**, 348, 1925. — 44) *H. Handovsky*, Die Einwirkung von organischen Basen und amphoteren Elektrolyten auf Eiweiß. Diese Zeitschr. **25**, 510, 1910. — 45) *A. Ellinger*, *P. Heymann* und *G. Klein*, Quellungsdruck der Eiweißkörper und Diurese. Zur Wirkungsweise des Coffeins als Diuretikum. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **91**, 1, 1921. — 46) *S. M.*

Neuschloss, Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Diuretica. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **41**, 664, 1924. — 47) *C. Porges* und *E. Neubauer*, Physikalisch-chemische Untersuchungen über das Lecithin und Cholesterin. Diese Zeitschr. **7**, 152, 1908. — 48) *E. A. Hafner*, Über die spezifische Rotationsdispersion der Serumeiweißfraktionen, Ebendaselbst **166**, 428, 1925. — 49) *E. A. Hafner* und *L. v. Kürthy*, Zur Kenntnis der Aussalzung. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **104**, 148, 1924. — 50) *R. Fürth*, Dielektrizitätskonstanten einiger wässeriger Lösungen und ihre Deutung nach der Dipoltheorie von *Debye*. Ann. d. Phys. **375**, 63, 1923. — 51) *R. Keller*, Neue Dielektrizitätskonstanten. Diese Zeitschr. **136**, 163, 1923. — 52) *P. Kyes*, Lecithin und Schlangengifte. Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 273, 1904. — 53) *Derselbe*, Über die Lecithide des Schlangengiftes. Diese Zeitschr. **4**, 99, 1907. — 54) *J. Morgenroth* und *U. Carpi*, Über ein Toxolecithid des Bienengiftes. Berl. klin. Wochenschr. 1906, S. 1424. — 55) *Dieselben*, Über Toxolecithide. Diese Zeitschr. **4**, 248, 1907. — 56) *I. Bang*, Kobragift und Hämolyse. Ebendaselbst **11**, 521, 1908. — 57) *E. Reiss*, Über das Verhalten von Fermenten in kolloidalen Lösungen. Hofmeisters Beitr. **7**, 151, 1907. — 58) *L. Michaelis* und *P. Rona*, Über die Löslichkeitsverhältnisse von Albumosen und Fermenten mit Hinweis auf ihre Beziehungen zu Lecithin und Mastix. Diese Zeitschr. **4**, 11, 1907. — 59) *H. Handovsky* und *R. Wagner*, Über einige physikalisch-chemische Eigenschaften von Lecithinemulsionen und Lecithineiweißmischungen. Ebendaselbst **39**, 32, 1911. — 60) *K. Frankenthal*, Über die Beziehung der Serumlipoide zu den Eiweißrefraktionen. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **42**, 501, 1925. — 61) *J. Forssman*, Die Herstellung hochwertiger spez. Schafhämolysine ohne Verwend. von Schafblut. Ein Beitrag zur Lehre von heterologer Antikörperbildung. Diese Zeitschr. **37**, 78, 1911. — 62) *R. Doerr* und *R. Pick*, Über den Mechanismus der primären Toxicität der Antisera und die Eigenschaften ihrer Antigene. Ebendaselbst **50**, 129, 1913. — 63) *F. Schiff*, Weitere Beiträge zur Frage der heterogenetischen Antikörper. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **20**, 336, 1914. — 64) *R. Doerr* und *R. Pick*, Untersuchungen über ein für die Art nicht spezifisches Eiweißantigen zellulären Ursprungs. Diese Zeitschr. **60**, 257, 1914. — 65) *K. Landsteiner*, Über heterogenetisches Antigen und Hapten. Ebendaselbst **119**, 294, 1921. — 66) *K. Landsteiner* und *S. Simms*, Production of heterogenetic antibodies with mixtures of the binding part of the antigen and protein. Journ. of exper. Med. **38**, 127, 1923. — 67) *N. Takenomata*, Über die Erzeugung heterogenetischer Antisera durch Vorbehandlung mit alkoholischem Pferdenierenextrakt und Schweineserum und über einige Eigenschaften derart erhaltener Immunsera. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **41**, 190, 1924. — 68) *H. Sachs* und *A. Klopstock*, Die serologische Differenzierung von Lecithin und Cholesterin. Diese Zeitschr. **159**, 491, 1925. — 69) *F. Georgi*, Beiträge zur Kenntnis der heterogenetischen Antigen-Antikörperreaktion. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **37**, 285, 1923. — 70) *F. Heimann*, Über die Eignung verschiedener Serumarten als Kombinationsmittel bei der Antikörpererzeugung durch heterogenetische Organextrakte und Lecithin. Ebendaselbst **44**, 44, 1925. — 71) *R. Doerr* und *C. Hallauer*, Kritische und experimentelle Untersuchungen über die Antigenfunktionen der Zell-Lipoide. Schweiz. med. Wochenschr. **55**, 962, 1925. — 72) *E. Freund* und *J. Joachim*, Zur Kenntnis der Serumglobuline. Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 407, 1902. — 73) *R. Doerr* und *W. Berger*, Globulin und Albumin aus demselben Blutserum als immunisatorische Antagonisten. Diese Zeitschr. **131**, 13, 1922. —

74) *E. Herzfeld* und *R. Klinger*, Eiweißchemische Grundlagen der Lebensvorgänge. Ebendaselbst **88**, 42, 1917. — 75) *Dieselben*, Die Eiweißfraktionen des Blutplasmas. Ebendaselbst **88**, 228, 1917. — 76) *Dieselben*, Neuere eiweißchemische Vorstellungen in ihren Beziehungen zur Immunitätslehre. Weichhardts Ergebn. **4**, 282, 1920. — 77) *E. A. Hafner*, Biologie und Dielektrizitätskonstante. Ergebn. d. Physiol. **24**, 566, 1925. — 78) *Derselbe*, Zur Nomenklatur der Serumeiweißkörper und der verschiedenen Serumviskositäten. Diese Zeitschr. **165**, 29, 1925. — 79) *P. Debye* und *J. Mc. Aulay*, Das elektr. Feld der Ionen und die Neutralsalzwirkung. Physikal. Zeitschr. **26**, 22, 1925. — 80) *P. Rusczynski*, Die Fällungskurve der Serumeiweißkörper. Diese Zeitschr. **152**, 250, 1924. — 81) *K. H. Mörner*, Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**, 207, 1902. — 82) *K. Spiro*, Über Nachweis und Vorkommen des Glykokolls, Ebendaselbst **28**, 174, 1899. — 83) *P. Hartley*, Biochem. Journ. **8**, 514, 1914. — 84) *F. Lieben*, Über die Nitrierung einiger Eiweißkörper. I. Diese Zeitschr. **145**, 535, 1924; II. **144**, 555, 1924. — 85) *O. Folin* und *J. M. Looney*, Colorimetric methods for the separate determination of Tyrosine, Tryptophane and Cystine in Proteins. Journ. of biol. Chem. **51**, 421, 1922. — 86) *E. A. Hafner*, Über die spezifische Rotationsdispersion der Serumeiweißfraktionen. Diese Zeitschr. **166**, 428, 1925. — 87) *M. Bergmann*, Über die Synthese hochmolekularer Anhydride von Zuckern und von Aminosäuren. Die Naturwiss. **13**, 799, 1925. — 88) *Derselbe*, Über neuere Proteinchemie. Die Naturwiss. **12**, 1155, 1925. — 89) *R. O. Herzog* und *H. W. Gonell*, Weitere Untersuchungen an Naturstoffen und biologischen Strukturen mittels Röntgenstrahlen. Die Naturwiss. **12**, 1153, 1924 (Lit.). — 90) *Dieselben*, Über Kollagen. Ber. d. deutsch. chem. Ges. **58**, 2228, 1925. — 91) *F. Umber*, Die Spaltung des kristallinischen Eier- und Serumalbumins sowie des Serumglobulins durch Pepsinverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 258, 1898. — 92) *E. Fischer* und *E. Abderhalden*, Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente. Ebendaselbst **39**, 81, 1903. — 93) *C. Oppenheimer* und *H. Aron*, Über das Verhalten des genuinen Serums gegen die tryptische Verdauung. Hofmeisters Beitr. **4**, 279, 1904. — 94) *H. H. Dale* und *P. Hartley*, Anaphylaxis to the separated Proteins of horse-serum. Biochem. Journ. **10**, 408, 1916. — 95) *R. Doerr* und *W. Berger*, Immunologische Analyse der komplexen Struktur des Serumeiweißes. Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt. **96**, 191, 1922. — 96) *Dieselben*, Über das Verhältnis der Fraktionsspezifität zur Artspezifität bei den Eiweißkörpern der Blutsera. Ebendaselbst **96**, 258, 1922. — 97) *H. Chick*, Biochem. Journ. 8, 404, 1914. — 98) *A. Schürmeyer*, Über Ionenantagonismus bei den Systemen Invertase—Eiweiß und Invertase—Lecithin. Pflügers Arch. **208**, 595, 1925. — 99) *Fr. V. Schulz* und *R. Zsigmondy*, Die Goldzahl und ihre Verwertbarkeit zur Charakterisierung von Eiweißstoffen. Hofmeisters Beitr. **3**, 137, 1902. — 100) *F. Jacobs*, Versuche über den kolloidalen Zustand v. Eiweiß u. Goldsolgemischen. Diese Zeitschr. **58**, 343, 1914. — 101) *W. Heubner* und *F. Jacobs*, Goldzahlbestimmungen an Eiweißkörpern des Blutes. Ebendaselbst **58**, 352, 1914. — 102) *J. Reitstötter*, Über die Goldzahl von normalem und pathologisch verändertem Blutserum. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **30**, 468, 1920. — 103) *R. Zsigmondy*, Lehrb. d. Kolloidchem., 5. Aufl., 1925, S. 233. — 104) *M. Polányi*, Über die Adsorption vom Standpunkt des dritten Wärmesatzes. Ber. d. physikal. Gesellsch. **16**, 1012, 1914. — 105) *A. Eucken*, Zur Theorie der Adsorption. Ebendaselbst **16**, 345, 1914. — 106) *M. Polányi*, Adsorption

von Gasen durch ein festes nichtflüchtiges Adsorbens. Ebendaselbst 18, 55, 1916. — 107) *A. Eucken*, Über die Theorie der Adsorptionsvorgänge. Zeitschr. f. Elektrochem. 28, 6, 1922. — 108) *J. Langmuir*, The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Journ. Amer. Chem. Soc. 38, 2221, 1917; I. Solids. — 109) *Derselbe*, The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica, and platinum. Ebendaselbst 40, 1361, 1918. — 110) *J. Reitstötter*, Sensibilisierung von Ferrihydroxydsolen durch elektrolytfreie Eiweißfraktionen aus normalen und Immunseris. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 30, 507, 1920. — 111) *St. Bächer*, Das Verhalten der Immunsera bei einigen Labilitätsreaktionen. Ebendaselbst 41, 360, 1924. — 112) *G. Ettisch* und *H. Runge*, Zur Frage der Sensibilisierung von Kongorot durch Globuline. Kolloid-Zeitschr. 37, 26, 1925. — 113) *J. Bauer* u. *St. Engel*, Über die chemische und biologische Differenzierung der drei Eiweißkörper in der Kuh- und Frauenmilch. Diese Zeitschr. 31, 46, 1911. — 113) *A. E. Burckhardt*, Beiträge zur Chemie und Physiologie des Blutserums. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 16, 322, 1883. — 115) *Th. St. Githens*, Einfluß von Nahrungs- und Blutentziehung auf die Zusammensetzung des Blutplasmas. Hofmeisters Beitr. 5, 514, 1903. — 116) *L. Moll*, Über Blutveränderungen nach Eiweißinjektionen. Ebendaselbst 4, 578, 1904. — 117) *G. C. Reymann*, Untersuchungen über die Eiweißfraktionen im Serum diphtherieimmunisierten Pferde nebst anderen, die Immunisierung betreffenden Verhältnisse. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 39, 15, 1924. — 118) *P. Morawitz*, Beobachtungen über den Wiederersatz der Bluteiweißkörper. Hofmeisters Beitr. 7, 153, 1906. — 119) *F. Cervello*, Einfluß der Antipyretica auf die Albuminoide des Blutserums. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 62, 357, 1909. — 120) *F. Breinl*, Beitrag zur Kenntnis der Serumeiweißkörper. Ebendaselbst 65, 308, 1911. — 121) *L. Langstein* und *M. Mayer*, Über das Verhalten der Eiweißkörper des Blutplasmas bei experimentellen Infektionen. Hofmeisters Beitr. 5, 69, 1903. — 122) *W. Seng*, Über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Eiweißkörper im Diphtherieheilserum. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 31, 513, 1899. — 123) *J. P. Atkinson*, The fractional precipitation of the globulin and albumin of normal Hors's serum and the diphtheric antitoxic serum and the antitoxic shength of the precipitales. Journ. of exper. Med. 5, 67, 1900. — 124) *Ph. H. Hiss* und *J. P. Atkinson*, Serum globulin and the diphtheric antitoxin. A comparative study of the amount of globulin in normal and antitoxic sera and the relation of the globulins to the antitoxic bodies. Ebenda 5, 47, 1900. — 125) *R. B. Gibson* und *A. E. Banzhaf*, The quantitative changes in the proteins in the blood plasma of horses in the course of immunization. Ebendaselbst 12, 411, 1910. — 126) *S. H. Hurwik* und *K. F. Meyer*, The serum globulins in bacterial infection and immunity. Ebendaselbst 24, 515, 1916. — 127) *G. C. Reymann*, Untersuchungen über die pathologische Globulinsteigerung. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 41, 209 bis 313, 1924. — 128) *St. Bächer* und *M. M. Kosian*, Der Eiweißaufbau, insbesondere das Globulin—Albuminverhältnis (Eiweißquotient) bei Immunseris. Diese Zeitschr. 145, 324, 1924. — 129) *J. H. Woolsey*, A comparison of the sera of the ox, sheep, hog, goat, dog, cat and guinea pig with respect to their content of various proteins. Journ. of biol. Chem. 14, 433, 1913. — 130) *H. C. Frenkel-Tissot*, Die biochemischen und biophysikalischen Beziehungen zwischen Erythrocyten und dem Eiweißsystem des Blutes Gesunder im Hochgebirge. Schweiz. med. Wochenschr. 3, 613, 635, 1922. — 131) *C. E. Wells*, The influence of age and of diet on the relative proportions

of serum proteins in rabbits. Journ. of biol. Chem. **15**, 37, 1913. — 132) *P. E. Howe* und *E. S. Sanderson*, Variations in the concentration of the globulin and Albumin fractions of the bloodplasma of young calves and a cow followring the injection of bacillus Abortus. Variations in the concentration of the protein fraction of the blood plasma of pregnant and non pregnant cows which have aborted. Ebendaselbst **67**, 767, 1924. — 133) *A. Carrel* und *H. H. Ebeling*, Antagonistic growth principles of serum and their relation to old age. Journ. of exper. Med. **38**, 419, 1923. — 134) *J. Csapo* und *D. v. Klobusitzky*, Einfluß der p_H auf die Salzflockung der Serumeiweißkörper. Diese Zeitschr. **151**, 90, 1924. — 135) *L. Moll*, Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin. Hofmeisters Beitr. **4**, 563, 1904. — 136) *Ch. Dhéré*, Recherches spectrales sur l'absorption ultra-violette, 1909. — 137) *S. V. Pinkus*, Journ. of Physiol. **27**, 57, 1901.

Direkte Ablesung des p_H beim Kompensationsverfahren mit Meßdraht.

Von

Aristides Kanitz.

(Eingegangen am 22. November 1925.)

Zur Berechnung der EMK bei Anwendung der gewöhnlichen Anordnung des Kompensationsverfahrens mit Meßdraht ist eine kleine Rechnung erforderlich. Deshalb bevorzugt man, sobald größere Bestimmungsreihen auszuführen sind, die Anordnung mit zwei Rheostaten nebst Vorschaltwiderstand, um so unmittelbar die EMK in Millivolt zu bekommen. Indessen auch im letzteren Falle muß man p_H entweder berechnen oder aus einer Tabelle entnehmen. Vielfach wird dazu das Büchlein von *Yllpö*[1]) verwendet. Dieses setzt aber die Anwendung der gesättigten Kalomelelektrode voraus und verlangt außerdem, daß die genannte Elektrode mit der Standardacetatelektrode bei 18 bis 20⁰ eine EMK von 517 Millivolt ergibt. Bekanntlich ist dies jedoch nicht der Fall, die gefundene Spannung ist oft kleiner, Werte um 514 Millivolt sind gar nicht selten. Ohne Anwendung der hieraus sich ergebenden Korrektur kann also der aus der Tabelle entnommene p_H-Wert bis zu 0,07 falsch sein. In den Tabellen fehlt ein Hinweis auf die Notwendigkeit dieser Korrektur, und ich habe auch sonst keine Erörterung dieses Punktes in der Literatur gefunden.

Sehr einfach läßt sich nun aber das Kompensationsverfahren mit Meßdraht so gestalten, daß man ohne Rechnung noch Tabellen p_H bei jeder Temperatur und bei Verwendung jeder Bezugselektrode unmittelbar an einer Skala ablesen kann.

Um dies zu erläutern, sei zunächst angenommen, daß bei 20^0 gearbeitet wird. Dann entspricht einem Konzentrationsunterschied von einer Zehnerpotenz der H-Ionen, also einer Einheit von p_H, eine

[1]) *A. Yllpö*, p_H-Tabellen, enthaltend ausgerechnet die Wasserstoffexponentenwerte, die sich aus gemessenen Millivoltzahlen bei bestimmten Temperaturen ergeben. Gültig für die gesättigte Kalomelelektrode. Berlin, J. Springer, 1917.

EMK von 58,1 Millivolt. Stellt man also auf dem 1 m langen Meßdraht einen Spannungsfall von

$$20 \times 58,1 = 1162 \text{ Millivolt}$$

her, so entspricht offenbar der Spannungsabfall über 1 mm des Meßdrahtes 0,02 p_H. Hat man nun eine Kette, bei der die eine H-Elektrode in eine H-Ionenlösung von der Normalität 1 und die andere H-Elektrode in die Lösung, deren p_H gesucht wird, eintaucht, so erhält man den gesuchten Wert von p_H, in 0,01 Einheiten ausgedrückt, ohne weiteres, indem man die EMK der Kette kompensiert, die Stelle des Schleifkontaktes abliest und die gefundene, in Millimetern ausgedrückte Kompensationsstrecke verdoppelt. Wäre z. B. der gesuchte Wert von p_H 6,56, so würde bei Stromlosigkeit im Nebenstromkreis der Schleifkontakt auf 328 mm stehen.

Wird nun an Stelle der Normalwasserstoffelektrode eine der gebräuchlichen Bezugselektroden angewandt, so muß man deren Spannung gegen die Normalwasserstoffelektrode in der Weise berücksichtigen, daß man sie gleichfalls in p_H ausdrückt, wozu man ja nur die in Millivolt gegebene Spannungsdifferenz mit 58,1 zu dividieren braucht (immer eine Versuchstemperatur von 20° vorausgesetzt). Hätte z. B. die gerade benutzte gesättigte Kalomelelektrode gegen die Normalwasserstoffelektrode die EMK von 249,2 Millivolt, so wäre diese Spannung, in p_H ausgedrückt,

$$249,2 : 58,1 = 4,289 \, p_H.$$

Diesem p_H entsprechen 214,45 mm des Meßdrahtes. Die oben als Beispiel angenommene Lösung mit 6,56 p_H würde also mit *dieser* Kalomelelektrode eine EMK haben, für deren Kompensation der Schleifkontakt auf

$$318 + 214,45 = 542,45 \text{ mm}$$

stehen müßte. Hätte die benutzte Kalomelelektrode gegen die Normalwasserstoffelektrode eine andere EMK, so wäre die Rechnung entsprechend auszuführen. Ebenso hätte man zu verfahren, wenn die Normal- oder die n/10-Kalomelelektrode zur Anwendung gelangen würde. Da die EMK der einzelnen Kalomelelektroden zwar verschieden ist, aber in der Regel konstant zu bleiben pflegt, so braucht man die Rechnung nur einmal zu machen. Für die Berechnung von p_H muß man also ganz allgemein von der gefundenen Kompensationsstrecke die auf die Kalomelelektrode entfallende Strecke abziehen und die sich ergebende Differenz verdoppeln.

Diese Rechnung läßt sich nun ebenfalls einfach ausschalten, indem man neben der Skala des Meßdrahtes eine zweite Skala anbringt, die sich verschieben läßt, und zugleich verdoppelt. Dazu beziffert man die verschiebbare, gleichfalls in Millimeter geteilte Skala so, daß bei

50 mm 1, bei 100 mm 2 usw. steht (mit entsprechender Bezifferung der Zwischenteilung). Bei Anwendung der als Beispiel angenommenen Kalomelelektrode wäre also die verschiebbare Skala so einzustellen, daß ihr Nullpunkt bei 214,45 mm der Meßdrahtskala zu stehen kommt; dann findet man durch Ablesen der Stelle der verschiebbaren Skala, die mit der Stelle des Schleifkontaktes zusammenfällt, unmittelbar p_H. Solange man mit derselben Kalomelelektrode arbeitet, kann man diese Nullstellung des „p_H-Schiebers" auch festmachen.

Auch für die neuerdings häufiger benutzte Chinhydronmethode ist der p_H-Schieber bequem verwendbar. Benutzt man die „Standardchinhydronelektrode", so muß man zu dem aus der Kompensationsstrecke sich ergebenden p_H-Wert 2,04 p_H zuzählen. Man führt diese Addition dadurch aus, daß man den p_H-Schieber so weit nach links verschiebt, bis der Nullpunkt der Meßdrahtskala mit dem Punkte 2,04 (102 mm) des p_H-Schiebers zusammenfällt, dann erhält man wieder unmittelbar p_H beim Ablesen. Schließlich kann man den p_H-Schieber auch bei der Kombination Chinhydronelektrode/Kalomelelektrode verwenden. In diesem Falle hängt bekanntlich die Stromrichtung vom p_H der zu messenden Lösung ab. Nach der jüngsten Veröffentlichung von *Cullen* und *Biilmann*[1]) besitzt die Chinhydronelektrode gegen die Wasserstoffgaselektrode die EMK von +703,5 Millivolt. Für die EMK der benutzten gesättigten Kalomelelektrode gegen die Normalwasserstoffelektrode ergab sich +250,3 Millivolt. Für die EMK der Chinhydronelektrode in einer Wasserstoffionenlösung von der Normalität 1 gegen die gesättigte Kalomelelektrode folgt demnach 453,2 Millivolt, wobei die Kalomelelektrode der negative Pol ist. Für jede Einheit von p_H vermindert sich diese EMK um 58,1 Millivolt, wird also bei

$$453{,}2 : 58{,}1 = 7{,}80\ p_H$$

Null, um darüber hinaus für jede Einheit von p_H um 58,1 Millivolt zu steigen, wobei dann die Kalomelelektrode der positive Pol ist. Mit dem p_H-Schieber bekommt man demnach p_H folgendermaßen: Solange die Kalomelelektrode negativ ist, schiebt man den Schieber so, daß der Punkt 7,80 des Schiebers mit der Stelle des Schleifkontaktes zusammenfällt, dann sucht man den Punkt des Schiebers auf, der mit dem Nullpunkt der Meßdrahtskala übereinstimmt. Dieser Punkt ist der gesuchte Wert von p_H. Ist die Kalomelelektrode der positive Pol, so verschiebt man den Schieber so, daß der Punkt 7,80 mit dem Nullpunkt der Meßdrahtskala übereinstimmt, und liest die Stelle des Schiebers, die mit der Stelle des Schleifkontaktes zusammenfällt, als den gesuchten Wert von p_H ab. Bei der Kombination Chinhydron-

---

[1]) *G. E. Cullen* and *E. Biilmann*, Journ. of biol. Chem. **64**, 735, 1925.

elektrode/Kalomelelektrode ist es prinzipiell empfehlenswerter, die EMK nicht direkt zu bestimmen, sondern durch Hintereinander- bzw. Gegeneinanderschaltung eines Normalelementes als Differenz zu ermitteln. Dadurch wird das Verfahren etwas verwickelter, da man diese Differenz berechnen muß, indessen kann man sich durch Verwendung des p_H-Schiebers auch in diesem Falle die ganze nachfolgende Rechnung ersparen.

Wie eine einfache Überlegung ergibt, ist eine eventuelle Meßdrahtkorrektur nur bei der Ablesung der Stelle des Schleifkontaktes zu berücksichtigen, während bei allen anderen Ablesungen die unmittelbar sich ergebenden Skalenteile zu benutzen sind.

Die Herstellung des benötigten Spannungsabfalls auf dem Meßdraht gelingt ganz einfach durch Verwendung eines geeigneten Vorschaltwiderstandes und Kompensation mit dem Normalelement. Der Vorschaltwiderstand kommt zwischen Anfang des Meßdrahtes und dem Akkumulator, das Normalelement wird so entgegengeschaltet, daß einer seiner Pole mit dem Anfang des Meßdrahtes, der andere mit dem Schleifkontakt verbunden ist (dazwischen kommt natürlich der Stromanzeiger). Ist der benötigte Spannungsabfall 1162 Millivolt und hat das Normalelement die EMK von z. B. 1018,6 Millivolt, so ergibt die Proportion

$$1162 : 1018{,}6 = 1000 : x,$$

$x = 876{,}6$. Man stellt also den Schleifkontakt auf 876,6 mm (unter Berücksichtigung der eventuellen Meßdrahtkorrektur) und variiert den Vorschaltwiderstand, bis Stromlosigkeit im Nebenstromkreis erreicht ist. Bei einem Meßdrahtwiderstand von etwa 14 Ohm und einer Akkumulatorspannung von 2 Volt liegt der vorzuschaltende Widerstand bei 10 Ohm. Verfügt man über einen Rheostaten, der bis 0,1 Ohm reicht, so stellt man den Widerstand bis 0,1 Ohm durch Stöpseln her, für die feinere Abstufung dient ein zwischen 1 und 0,1 Ohm parallel geschalteter Draht mit Schleifkontakt, durch dessen Verschiebung die genaue Kompensation hergestellt wird. Ich habe dazu den aufgewickelten Draht, der gewöhnlich als Vorschaltwiderstand dem Induktorium zur Leitfähigkeitsbestimmung beigegeben wird, gut verwenden können. Natürlich kann dem Vorschaltwiderstand auch eine andere Anordnung gegeben werden. Wenn man den Widerstand des Meßdrahtes kennt, so kann man den Vorschaltwiderstand von vornherein so einstellen, daß der verschiebbare Widerstand zur Erzielung der Kompensation nur noch wenig verändert werden muß, dem Normalelement somit kein nennenswerter Strom entzogen wird. Jedenfalls liegen in dieser Hinsicht die Verhältnisse nicht ungünstiger als bei der Bestimmung der Klemmspannung des Akkumulators bei der gewöhn-

lichen Kompensationsanordnung. Von Zeit zu Zeit ist die Spannung nachzuprüfen und durch entsprechende Verschiebung des Vorschaltwiderstandes unverändert zu erhalten. Prinzipiell am richtigsten ist es sogar, nach jeder Messung die Spannung nachzuprüfen. Die Spannung eines Akkumulators mit genügender Kapazität bleibt indessen schon bei der gewöhnlichen Kompensationsanordnung verhältnismäßig lange konstant. Da bei der beschriebenen Anordnung der Gesamtwiderstand, durch den der Akkumulator geschlossen ist, um rund 70 Proz. größer ist, steht es hinsichtlich der Konstanz der Spannung entsprechend günstiger. Ebenso ist die Ablesungsgenauigkeit bei der Anordnung entsprechend vergrößert.

Will man bei einer anderen Temperatur als bei 20^0 arbeiten, so ist der ganzen Eichung die bei der betreffenden Temperatur für die p_H-Einheit gültige Millivoltzahl zugrunde zu legen. Bei 18^0 also 57,7 Millivolt usw. Es sei betont, daß die Stellung des Schleifkontaktes, die bei der Kompensation mit dem Normalelement den gewünschten Spannungsabfall für den 1000 mm langen Meßdraht ergibt, für jede Temperatur eine Konstante ist, somit, ein geeichtes Normalelement vorausgesetzt, nur einmal berechnet werden muß.

Der absolute und prozentuale Alkaloidgehalt der einzelnen Teile der Keimlinge und der jungen Pflanze von Strychnos nux vomica L. während der Keimung.

Von

Th. Sabalitschka und **C. Jungermann.**

(Eingegangen am 24. November 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Anschließend an unsere vorhergehende Mitteilung[1]) über den absoluten und prozentualen Alkaloidgehalt der einzelnen Teile von Lupinus luteus L. während der Vegetation sei über das Verhalten des Alkaloidgehalts der Strychnospflanze, Strychnos nux vomica L. im ersten Vegetationsstadium berichtet, d. h. in den ersten 7 Monaten nach der Aussaat. Die Strychnospflanze enthält die Alkaloide Strychnin und Brucin in wechselnden Mengenverhältnissen; im Samen finden sich diese Alkaloide ungefähr zu gleichen Teilen, weshalb das deutsche Arzneibuch bei der Bestimmung des Alkaloidgehalts der Samen das mittlere Molekulargewicht der beiden Alkaloide $\frac{334 + 394}{2} = 364$ benutzt.

Die Samen enthielten 2,19 Proz. Alkaloid oder 100 Samen enthielten 3,15 g Alkaloid. Die auf feuchter Watte zum Keimen gebrachten Samen wurden in Sand übertragen, später dann in Gartenerde umgesetzt. Bei Versuch A wurde der Alkaloidgehalt der Keimlinge 47 und 215 Tage nach der Aussaat, bei Versuch B 121 und 163 Tage nach der Aussaat bestimmt, und zwar sowohl der absolute wie der prozentuale; ersterer bezieht sich auf 100 Pflanzen, letzterer auf das Trockengewicht.

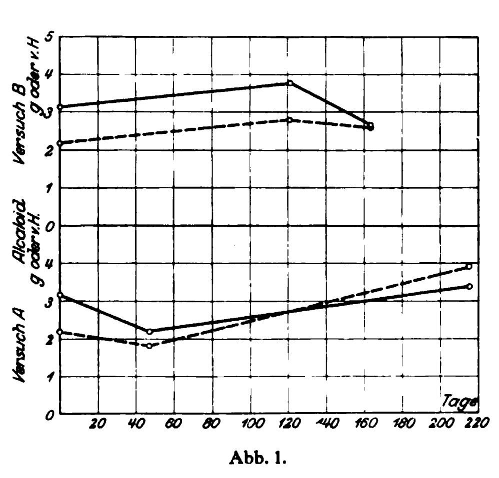


Abb. 1.

Absolute und prozentuale Alkaloidmenge, —— absolut, ----- prozentual.

Abb. 1 zeigt das Verhalten des Alkaloidgehalts der ganzen Pflanzen bei beiden Versuchen. Bei Versuch A sinkt sowohl der absolute wie

[1]) *Th. Sabalitschka* und *C. Jungermann*, diese Zeitschr. **168**, 445, 1925.

der prozentuale Alkaloidgehalt während der Keimung der Samen bis zum 47. Tage; während 100 Samen ursprünglich 3,15 g Alkaloid enthielten, waren in 100 Keimlingen nunmehr noch 2,2 g Alkaloid. Der ursprüngliche Prozentgehalt von 2,2 war auf 1,8 zurückgegangen. Daß dieser Rückgang nicht auf eine Diffusion von Alkaloid nach außen zurückzuführen ist, zeigten unsere schon berichteten[1]) diesbezüglichen Untersuchungen; es konnten in den Keimbeeten unter normalen Keimungsverhältnissen auch nicht Spuren von Alkaloid nachgewiesen werden, während *O. Tunmann*[2]) früher einen Austritt des Alkaloids ohne genügend beweisende Versuche annahm. Nach 215 Tagen sehen wir dann ein erhebliches Ansteigen des absoluten Alkaloidgehalts auf 3,4, und des prozentualen auf 3,9; beide Werte übertreffen die entsprechenden Werte der ursprünglichen Samen. Nach 47 Tagen hatte sich aus den Samen ein ungefähr 10 cm langes Würzelchen gebildet, nach 215 Tagen waren die Keimblätter entfaltet, die Samenrückstände abgefallen und außerdem noch zwei bis drei Laubblattpaare entwickelt.

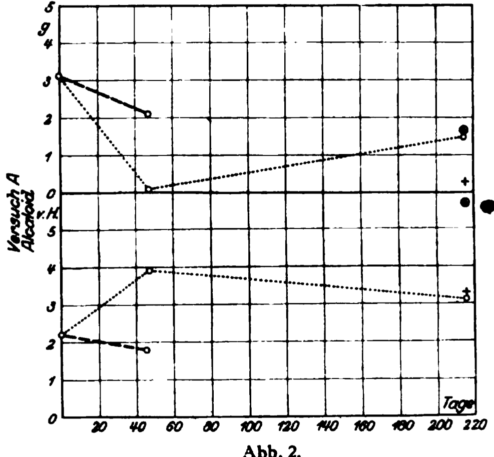


Abb. 2.
Absoluter und prozentualer Alkaloidgehalt der einzelnen Teile. Versuch A.
····· Same. + Stengel. ····· Wurzel.
⊕ Keim- und Laubblätter.

Bei Versuch B wurde die Untersuchung erst nach 121 Tagen ausgeführt; es tritt hier das Sinken des Alkaloidgehalts überhaupt nicht mehr in die Erscheinung, vielmehr ist sowohl der absolute, wie der prozentuale Alkaloidgehalt bereits etwas höher als bei den Samen. Nach 121 Tagen war aus den Samen erst eine Wurzel ausgetreten, welche eine Länge von 20 bis 30 cm erreicht hatte; der Same war mehr als 5 cm über den Boden emporgehoben, hatte sich aber noch nicht geöffnet. Bei seiner Öffnung fanden wir darin die kräftig entwickelten, gefalteten Keimblätter bedeckt von einer stark alkaloidhaltigen Schleimschicht. Die für die ganze Pflanze beobachtete Erhöhung des absoluten und prozentualen Alkaloidgehalts erfolgte in den Samen und Keimlingen, ohne daß diesen Stickstoff von außen zugeführt wurde; das

[1]) *Th. Sabalitschka* und *C. Jungermann*, Pharmazeut. Zentralhalle **66**, 474 und 501, 1925.

[2]) Arch. d. Pharm. 248, 644, 1910; *O. Tunmann*, Pflanzenmikrochemie. S. 320. Berlin 1913.

Alkaloid muß also aus anderen, in den Samen ursprünglich vorhandenen Stickstoff enthaltenden Substanzen entstanden sein. Während bis zum 47. Tage die Alkaloid abbauenden oder verbrauchenden Vorgänge überwiegen, überwiegen nunmehr zwischen dem 47. und 121. Tage die Alkaloid liefernden Vorgänge. Es sei noch darauf hingewiesen, daß durch die Versuchsanordnung eine Assimilation von Stickstoff, durch die vorläufige Entwicklung der Keimlinge eine Assimilation von Kohlenstoff ausgeschlossen war; durch Assimilationsvorgänge kann diese Vermehrung des Alkaloids hier nicht bedingt sein. Dies ist ein typischer Fall, in dem nach *J. Gadamer*[1]) Alkaloidbildung auf Kosten des vorhandenen (Reserve-) Eiweißes stattfindet.

Die nächste Untersuchung der Keimlinge fand nach 163 Tagen statt. Zwischen 121 und 163 Tagen hatten sich die Samen entfaltet und waren die Samenrückstände abgefallen. Wir sehen hier ein Sinken des absoluten Alkaloidgehalts von 3,8 auf 2,7 g; sicher ist dieses mindestens zum Teil auf einen Verlust an Alkaloid durch das Abwaschen des stark alkaloidhaltigen Schleimes von den entfalteten Keimblättern durch künstlichen Regen im Gewächshaus zurückzuführen. Von diesem mechanischen Verlust an Alkaloid ist die Kurve des prozentualen Alkaloidgehalts kaum beeinflußt.

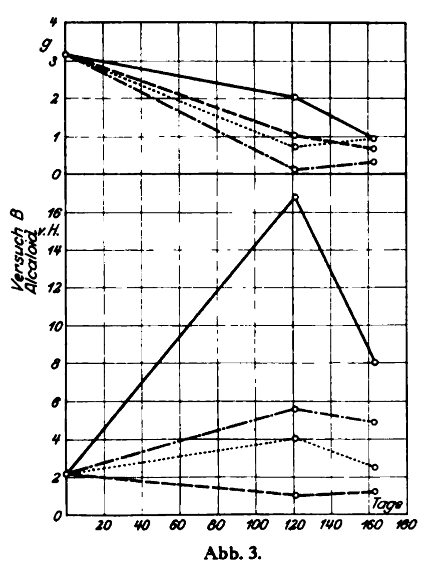


Abb. 3.
Absoluter und prozentualer Alkaloidgehalt der einzelnen Teile. Versuch B.
—— Keimblätter. ----- Samen und Samenrückstand. ····· Wurzel.
—·—·— Hypokotyl und Stengel.

Abb. 2 und 3 zeigen das Verhalten des Alkaloidgehalts der einzelnen Teile. Bei Versuch A ist nach 47 Tagen der absolute Alkaloidgehalt sowohl in den Samen, wie auch in der bereits ausgetretenen Wurzel gesunken; er beträgt gegenüber 3,15 g in den ursprünglichen Samen jetzt in den Samen nur mehr 2,1 g, in den Wurzeln erst 0,12 g; die Wurzel weist aber einen fast doppelt so hohen prozentualen Alkaloidgehalt auf als die ursprünglichen Samen, nämlich 3,9 gegen 2,2, während deren prozentualer Alkaloidgehalt von 2,2 auf 1,8 gefallen ist; neben

[1]) *J. Gadamer*, „Die Alkaloide" in Handb. d. prakt. u. wiss. Pharmazie von *H. Thoms*, 2, 737, 1925.

der Abnahme des gesamten Alkaloidgehalts gegenüber den ursprünglichen Samen fand eine Anreicherung des Alkaloids in der Wurzel statt. Mit der weiteren Entwicklung der Wurzeln bis zu 215 Tagen steigt dann auch die dort vorhandene absolute Alkaloidmenge von 0,12 auf 1,5 g, während die prozentuale etwas, d. h. von 3,9 auf 3,1 sinkt. Zu dieser Zeit enthalten Wurzeln und Blätter ungefähr gleiche Alkaloidmengen, nämlich je 1,5 g, die Stengel 0,36 g. Andererseits ist der prozentuale Alkaloidgehalt von Wurzeln und Stengeln ungefähr derselbe, 3,1 und 3,3, dagegen beträgt der Gehalt der Blätter 5,7 Proz. Die ersten Laubblätter und die Keimblätter haben einen weit höheren prozentualen Alkaloidgehalt als die übrigen Teile der jungen Pflanze. Es zeigt sich auch hier, wie schon früher bei der Hauptvegetation der Lupine[1]), daß in den Blättern die Alkaloidsynthese den Alkaloidabbau oder Verbrauch erheblich überwiegt oder die Alkaloide den Blättern besonders zugeleitet werden.

Die Kurven des absoluten Alkaloidgehalts der einzelnen Teile sinken bis nach 121 Tagen von dem ursprünglichen Gehalt der Samen von 3,15 g auf 1,99 g bei den Keimblättern, auf 1,02 g bei den Samenrückständen, auf 0,70 g bei den Wurzeln und auf 0,12 g bei den Stengeln; zusammen enthalten diese vier Teile aber mehr Alkaloid als die ursprünglichen Samen, wie schon vorher angegeben ist. Zwischen 121 und 163 Tagen steigt die Alkaloidmenge in Wurzeln und Stengeln an, sie fällt dagegen in den Samenrückständen und noch stärker in den Keimblättern; bei den Samenrückständen sinkt sie von 1,02 auf 0,65 g, bei den Keimblättern von 1,99 auf 0,91 g. Es wird somit Alkaloid aus den Samenrückständen entnommen oder dort irgendwie abgebaut; der Alkaloidverlust der Keimblätter ist mindestens zum Teil auf ein Abwaschen des die Keimblätter im Samen bei 121 Tagen noch bedeckenden alkaloidreichen Schleimes zurückzuführen, was schon oben bei der Verminderung des Alkaloidgehalts der ganzen Pflanze erwähnt ist. Es erscheint aber auch möglich, daß das nach 121 Tagen in den Keimblättern enthaltene Alkaloid bei der weiteren Entwicklung des Keimlings teilweise aus den Keimblättern entfernt oder abgebaut wurde, wie wir dies früher bei den absterbenden Keimblättern der Lupine beobachtet haben.

Der prozentuale Alkaloidgehalt sinkt von der Aussaat bis zum 121. Tage nur bei dem Samenrückstand, und zwar von 2,2 auf 1 Proz., während bei den anderen Teilen der Gehalt ansteigt, bei den Wurzeln auf 4,0, dem Hypokotyl auf 5,6 und den Keimblättern einschließlich des ihnen ansitzenden Schleimes auf 16,8 Proz. Auch hier sehen wir eine Verschiebung des Alkaloids aus dem Samenrückstand in den sich

[1]) Diese Zeitschr. 168, 448, 1925.

entwickelnden Embryo, besonders in dessen Keimblätter und den diese einhüllenden Schleim. Vom 121. bis zum 163. Tage sinkt der prozentuale Alkaloidgehalt in allen Teilen des Keimlings, nämlich in der Wurzel von 4 auf 2,5, in dem Hypokotyl von 5,6 auf 4,9 und in den Keimblättern von 16,8 auf 8,1; dem Sinken des prozentualen Gehalts entspricht auch eine Abnahme des absoluten der ganzen Pflanze und der Keimblätter, und es gelten die dort gegebenen Erklärungen. Es steigt aber der prozentuale Alkaloidgehalt des Samenrückstandes etwas an, nämlich von 1,0 auf 1,2. Da vorher gesagt ist, daß die absolute Alkaloidmenge in den Samen sinkt, kann das geringe Ansteigen des prozentualen Gehalts nur auf eine stärkere Reduktion der übrigen Substanz der Samenrückstände zurückgeführt werden; die sonst in den Samenrückständen noch vorhandenen Stoffe müssen während der Entwicklung der jungen Pflanzen stärker abgebaut oder verbraucht worden sein als die Alkaloide, die aber an sich auch teilweise aus den Samenrückständen entfernt wurden. Es war auch in den vorhergehenden Perioden, sowohl bei Versuch A zwischen der Aussaat und dem 47. Tage, wie auch bei Versuch B zwischen der Aussaat und dem 121. Tage für den prozentualen Alkaloidgehalt des Samenrückstandes ein geringeres Sinken festgestellt als für den absoluten; dies stimmt gleichfalls mit der Annahme überein, daß andere Inhaltsstoffe des Endosperms stärker von dem Keimling aufgenommen werden als die Alkaloide. Das Verhalten des absoluten und prozentualen Alkaloidgehalts des von dem heranwachsenden Keimling verbraucht werdenden Endosperms entspricht ganz dem Verhalten des absoluten und prozentualen Alkaloidgehalts der absterbenden Keimblätter der Lupine, denen ja auch die Rolle eines Endosperms zukommt. Wir[1]) hatten dort ebenfalls eine Abnahme des absoluten, aber eine Zunahme des prozentualen Alkaloidgehalts festgestellt und diese Tatsache durch die Abnahme der Trockensubstanz infolge des Verbrauches an Nährstoffen während der Keimung erklärt; diese Erklärung dürfte auch hier zutreffen. Wie in den absterbenden und abfallenden Keimblättern der Lupine das Alkaloid nicht ganz verschwindet, so verschwindet es ebenso nicht in den abfallenden Samenresten bei Strychnos; sie enthielten noch ungefähr ein Fünftel der ursprünglich in den Samen vorhandenen Alkaloidmenge; unsere Beobachtung deckt sich vollkommen mit der Berechnung von *O. Tunmann*[2]), nach welcher ein Fünftel des Alkaloids in den abfallenden Samenresten zurückbleiben soll.

Es seien die von *O. Tunmann* bei ähnlichen Versuchen gefundenen Alkaloidgehalte den hier erhaltenen gegenübergestellt:

---

[1]) Diese Zeitschr. **168**, 449, 1925.
[2]) l. c.

	Tunmann		*Sabalitschka* und *Jungermann*	
	Alkaloidmenge in 100 Pflanzen	Alkaloidgehalt	Alkaloidmenge in 100 Pflanzen	Alkaloidgehalt
	g	Proz.	g	Proz.
Samen	5,56	2,98	3,15	2,19
Junge Wurzel . . .	1,8	4,48	0,70	4,0
Ältere Wurzel . . .	2,1	3,72	1,48	3,1
Junge gelbe Keimblätter	1,44	6,62	1,99	16,8
Grüne ausgewachsene Keimblätter . . .	1,56	4,65	1,53	5,7
Abgeworfene Samenrückstände	1,05	2,11	0,65	1,2
Hypokotyl	0,3	2,43	0,32	4,9

Diese Zahlen stimmen meist so weit überein, als das bei der Ungleichmäßigkeit des jeweiligen Alters der untersuchten Pflanzen, der Ausgangssamen und der Versuchsbedingungen überhaupt zu erwarten war. Nur in dem Hypokotyl und den jungen Keimblättern fanden wir einen wesentlich höheren prozentualen Alkaloidgehalt als *O. Tunmann*. Bei den jungen Keimblättern ist dies sicher zum Teil auf den ihnen ansitzenden alkaloidreichen Schleim zurückzuführen, den wir in die Untersuchung mit einzogen. Gleichmäßig ist bei den Versuchen von *O. Tunmann* und uns das Ansteigen der absoluten Alkaloidmenge und das Fallen des prozentualen Alkaloidgehalts mit dem Alter des Pflanzenteiles.

Wie bei den Versuchen mit der Lupine war auch hier bei der Strychnospflanze eine Verminderung der ursprünglichen Alkaloidmenge der Samen beim Keimen zu beobachten; dies läßt auf einen Abbau oder Verbrauch des Alkaloids beim Keimen schließen. Bei der Ausnutzung des Endosperms durch den heranwachsenden Keimling nimmt die ursprüngliche Gewichtsmenge des Alkaloids weiter ab, aber nicht im gleichen Maße wie die anderen im Endosperm vorhandenen und vom Keimling verbrauchten Stoffe. Das Alkaloid verschwindet aus den Samenrückständen nach der Entfaltung der Keimblätter nicht gänzlich; es geht vielmehr ungefähr ein Fünftel des ursprünglich in den Samen vorhandenen Alkaloids bei dem Abfallen der Samenreste von der jungen Pflanze verloren. Als ein typischer, unter normalen Keimungsverhältnissen größtenteils ausgenutzter Nährstoff kann das Alkaloid schon deshalb nicht gelten, da es beim Keimen überhaupt nur eine Verminderung um ungefähr 25 Proz. erfährt. Eine starke Anreicherung an Alkaloid findet in den Keimblättern statt, während sie noch im Samen eingeschlossen sind, und in dem sie dort einhüllenden Schleim; auch sonst ist eine Verschiebung des Alkaloidgehalts von dem Endosperm in den Keimling während der Keimung zu beobachten. Der absolute Alkaloidgehalt nimmt dann während der weiteren Ent-

wicklung der jungen Pflanze ständig zu, während der prozentuale etwas abnimmt. Auch bei Ausschluß jeder Stickstoffzufuhr nimmt die Alkaloidmenge beim Keimen zu; das Alkaloid muß dabei auf Kosten anderer in dem Samen vorhandener stickstoffhaltiger Substanzen entstanden sein; diese Vermehrung des Alkaloids ohne Stickstoffzufuhr von außen geschah zu einer Zeit, in welcher die Pflanze auch zu einer Kohlenstoffassimilation noch nicht befähigt war.

Die beobachteten Verschiebungen des Alkaloids von einem Pflanzenteil in einen anderen wollen wir auch hier, wie schon früher bei der Lupine, nicht unbedingt oder ausschließlich auf eine Wanderung des Alkaloids zurückführen; es ist auch möglich, daß durch entgegengesetzt verlaufende Umsetzungen in den verschiedenen Pflanzenteilen Alkaloid gleichzeitig abgebaut und aufgebaut wird, und daß bald diese, bald jene Umsetzung vorherrscht oder ausschließlich stattfindet.

Es sei noch bemerkt, daß die Strychnospflanze gerade mit Vorliebe von tierischen Schädlingen heimgesucht wurde; Schnecken und kleine Insekten fraßen im Gewächshaus die Keim- und Laubblätter trotz ihres hohen Alkaloidgehalts so stark an, daß es schwer war, unversehrte Pflanzen zu den Versuchen zu erhalten. Von einem Schutze der Pflanze durch die Alkaloide gegen Tierfraß war somit nichts zu bemerken; da man auch bei Berlin nicht die Anwesenheit besonderer, infolge Anpassung gegen Strychnin und Brucin immuner Tiere wird annehmen können, dürfte die zur Erklärung der pflanzenphysiologischen Bedeutung der Alkaloide von *O. Tunmann*[1]) aufgestellte Schutzstoffhypothese hier kaum zutreffen.

Wir fanden eine Verminderung der ursprünglichen Alkaloidmenge der Samen beim Keimen um ungefähr ein Viertel; *O. Tunmann* hatte ebenfalls bei seinen Versuchen eine solche Verminderung festgestellt, und zwar um ungefähr ein Drittel. Dieser Forscher wollte die Verminderung auf ein Auslaugen des Alkaloids durch das Wasser des Keimbeetes zurückführen, ohne aber einen Übertritt des Alkaloids in das Wasser nachgewiesen zu haben. Wir zeigten[2]) daß unter normalen Bedingungen ein Übertritt des Alkaloids überhaupt nicht stattfindet; somit ist auch die früher von *O. Tunmann* beobachtete, von ihm damals nicht richtig gedeutete Verminderung des Alkaloids beim Keimen der Strychnossamen durch einen Abbau des Alkaloids zu erklären.

Versuch A.

Zu den Versuchen standen uns frische keimfähige Samen zur Verfügung, welche wir durch die liebenswürdige Vermittlung des Herrn Dr.

[1]) Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **24**, 271, 1914; Arch. d. Pharm. **248**, 653, 1910.

[2]) *Th. Sabalitschka* und *C. Jungermann*, Pharm. Zentralhalle **66**, 474 und 501, 1925.

Sardesai aus Bombay erhielten. Der Alkaloidgehalt der Samen wurde nach dem Verfahren von *Th. Sabalitschka* und *C. Jungermann* [1]) bestimmt; 100 Samen enthielten 3,15 g Alkaloid; der Alkaloidgehalt betrug 2,19 Proz. Er war also geringer als der vom Deutschen Arzneibuch 5. geforderte Mindestgehalt von 2,5 Proz.

Am 24. November 1923 wurden 32 Samen in einer flachen Glasschale zur Keimung ausgelegt. Als Keimbeet diente chemisch reine Watte, die mit destilliertem Wasser feucht gehalten wurde. Auf dieser Watte lagen die Samen und waren auch von einer solchen bedeckt. Die Glasschale stellten wir bedeckt im dunklen Thermostaten bei 21° auf, beobachteten die Samen täglich, hielten die Watte genügend feucht und erneuerten sie sofort, falls sich Schimmel zeigte. Die Samen waren keiner Vorquellung unterworfen. Späterhin verwendeten wir als Keimbeet chemisch reinen ausgeglühten Seesand; auf die Reinheit der Keimbeete legten wir besonderen Wert, da an ihnen auch der Austritt der Alkaloide aus den keimenden Samen studiert werden sollte. Wie wir [2]) schon berichteten, fand ein solcher nicht statt.

Nach 20 Tagen, am 14. Dezember 1923, war bei einigen Samen ein Hervortreten des Würzelchens bemerkbar; *Tunmann* [3]) konnte dasselbe bei seinen Keimungsversuchen nach 3 Wochen beobachten, was mit unserer Feststellung übereinstimmt. Am 17. Dezember betrug die größte Länge des Würzelchens 0,3 cm; am 20. Dezember waren 62 Proz. der Samen gekeimt, während der Rest überhaupt nicht keimte. Die sich sofort nach unten krümmenden Wurzeln entwickeln sich rasch und erreichen am 7. Januar eine Länge von 10 cm. Die Ernährung geschieht ausschließlich durch das Endosperm des Samens, der stark geschwollen, aber noch geschlossen ist. Am 10. Januar 1924 entnahmen wir zur Untersuchung zehn Keimlinge dem Beet. Die übrigen zehn Keimlinge wurden zu je zwei auf Bechergläser aus Jenaer Glas verteilt, die mit reinstem Seesand beschickt waren; sie stellten wir weiter im Thermostaten bei 21° auf; dieser Thermostat war mit einem Fenster versehen, so daß die Pflanzen sich im Tageslicht befanden. Die Zubereitung der Sandkultur geschah nach *E. G. Pringsheim* [4]); eine Zugabe von Nährsalz fand nicht statt.

Am 4. Februar 1924 hatten die Wurzeln eine Länge von 15 bis 20 cm erreicht. Erst nach mehr als 3 Monaten, anfangs März, begann das Wachstum des Hypokotyls und die Samen erschienen über dem Boden. Am 8. März 1924 brachten wir die Gefäße in das Warmhaus des botanischen Gartens, wo sie nunmehr bei einer durchschnittlichen Temperatur von 28° sich befanden. Nach 4 Monaten, anfangs April, waren die Samen noch fest geschlossen; sie ragten etwa 5 cm über dem Boden hervor. Am 7. Mai 1924 setzten wir dann die Pflanzen in Töpfe mit Gartenerde um und beließen sie dort weiter im Warmhaus bis zur Ernte. Ungefähr 5 Monate nach der Aussaat öffneten sich die Samen erst, die leeren Samenschalen fielen ab und die Keimblätter entfalteten sich. Am 2. Juni 1924 waren die Keimblätter 4 bis 5 cm lang und 3 bis 4 cm breit; das Hypokotyl maß 10 bis 15 cm. Am 16. Juni 1924

---

[1]) Ebendaselbst **66**, 145, 1925.

[2]) l. c.

[3]) l. c.

[4]) *E. G. Pringsheim*, Methoden der Sand- und Wasserkultur höherer Pflanzen in *E. Abderhaldens* Handb. d. biol. Arbeitsmethod., Abt. II, Teil 2, S. 645.

hatte sich auch ein Laubblattpaar, am 21. Juni 1924 ein zweites und am 24. Juni 1924 bei einigen Pflanzen schon ein drittes entwickelt. Am 26. Juni 1924 entnahmen wir drei gleichmäßig gut entwickelte, durch Tierfraß möglichst wenig beschädigte Pflanzen zur Untersuchung.

1. Untersuchung.

Vegetationszeit 24. November 1923 bis 10. Januar 1924. Alter der untersuchten Pflanzen 47 Tage.

Die zehn aus dem Keimbeet entnommenen Keimlinge wurden mit der Schere in Wurzeln und Samen getrennt, die beiden Teile gewogen, bei 80° im Lufttrockenschrank getrocknet, fein gepulvert und bis zum konstanten Gewicht weiter getrocknet; hierauf ermittelten wir den Alkaloidgehalt nach der von uns früher mitgeteilten Methode[1]).

Tabelle I.

Pflanzenteil	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Gefundenes Alkaloid g	Alkaloidgehalt Proz.	Alkaloidgehalt in 100 Pflanzen g
Samen	13,760	11,7600	0,2105	1,8	2,105
Wurzel	1,527	0,2980	0,0116	3,9	0,116
Ganze Pflanzen .	15,287	12,0580	0,2221	—	2,221

2. Untersuchung.

Vegetationszeit 24. November 1923 bis 26. Juni 1924. Alter der Pflanzen 215 Tage. Die Pflanzen, drei an der Zahl, wurden in Blätter (Keimblätter und Laubblätter), Stengel und Wurzel geteilt, und sonst wurde wie bei der ersten Untersuchung verfahren.

Tabelle II.

Pflanzenteil	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Gefundenes Alkaloid g	Alkaloidgehalt Proz.	Alkaloidgehalt in 100 Pflanzen g
Blätter	3,048	0,8108	0,0459	5,7	1,53
Stengel	1,176	0,3302	0,0109	3,3	0,36
Wurzel	7,722	1,4276	0,0444	3,1	1,48
Ganze Pflanzen .	11,946	2,5686	0,1012	—	3,37

Versuch B.

Am 15. Januar 1924 legten wir in gleicher Weise wie oben 64 Samen in feuchte Watte zur Keimung. Schon nach 15 Tagen war bei mehreren Samen das Würzelchen bemerkbar; am 7. Februar 1924 waren 73 Proz.

[1]) l. c.

der Samen gekeimt; die übrigen keimten überhaupt nicht mehr. Am 11. Februar war das Würzelchen durchschnittlich 1 cm, am 14. Februar 2 cm und am 18. Februar 3 cm lang. Am 18. Februar wurden die Keimlinge wie bei Versuch A in reinen Seesand umgesetzt, ohne daß ihnen Nährsalzlösung geboten wurde. Am 8. März erschienen die Samen über dem Boden. Von jetzt ab standen die Gefäße in dem mit einem Fenster versehenen Thermostaten bei 21°. Am 25. April betrug die Länge des oberirdischen Teiles 5 cm, die Wurzel hatte bei 20 cm Länge den Boden der Bechergläser erreicht und legte sich ringförmig am Boden um. Am 15. Mai entnahmen wir 20 Pflanzen, die gleichmäßig gut entwickelt waren, zur Untersuchung. Bis jetzt waren die Pflanzen nur mit destilliertem Wasser begossen.

Die restlichen Pflanzen wurden in Erde umgepflanzt und verblieben so im Warmhaus bei 28° bis zum 26. Juni 1924; jetzt wurden acht gleichmäßig gut entwickelte und nicht durch Tierfraß zu stark beschädigte Pflanzen zur Untersuchung entnommen; auch die abgefallenen Samenschalen wurden sorgfältig gesammelt und für sich untersucht. Die Keimblätter waren voll entfaltet. Eine Anzahl der nicht zur Untersuchung benötigten Pflanzen blieb zur weiteren Beobachtung im Warmhaus; sie hatten bis zum 1. September 1924 je sechs Laubblattpaare entwickelt und maßen etwa 25 cm im oberirdischen Teil. Bei beiden Versuchen trat das Würzelchen ungefähr zur gleichen Zeit wie bei den Versuchen *Tunmanns*[1]) aus den Samen hervor; es entwickelten sich aber hier die Keimlinge langsamer als bei *Tunmann*.

3. *Untersuchung.*

Vegetationszeit 15. Januar bis 15. Mai 1924. Alter der Pflanzen 121 Tage. Während der ganzen Vegetation war den Pflanzen von außen kein Stickstoff zugeführt, sowohl nicht in der Watte, wie auch nicht in dem Sandbeet. Die zur Untersuchung entnommenen 20 Pflanzen wurden getrennt in Wurzel, Hypokotyl, Keimblätter und Samenrückstand. Die Samen öffneten wir von der Randleiste her und entfernten daraus die gelben, in zahlreichen Falten zusammengelegten und eng an das Endosperm angedrückten Keimblätter. Sie waren mit einer stark alkaloidhaltigen Schleimschicht bedeckt. Wurzel, Hypokotyl, Keimblätter (mit Schleimschicht) und Samenrückstände wurden für sich untersucht.

Tabelle III.

Pflanzenteil	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Gefundenes Alkaloid g	Alkaloidgehalt Proz.	Alkaloidgehalt in 100 Pflanzen g
Wurzel	10,6110	3,5096	0,1390	4,0	0,695
Hypokotyl	1,5560	0,4442	0,0248	5,6	0,124
Samenrückstand .	33,7320	21,1576	0,2040	1,0	1,020
Keimblätter . . .	5,7088	2,3576	0,3988	16,8	1,994
Ganze Pflanzen .	51,6068	27,4690	0,7666	—	3,833

[1]) l. c.

4. Untersuchung.

Vegetationszeit 15. Januar bis 26. Juni 1924. Alter der Pflanzen 163 Tage. Die acht Pflanzen wurden getrennt in Keimblätter, Hypokotyl und Wurzel und nicht nur diese Teile untersucht, sondern auch die sorgfältig gesammelten Samenschalen, die bereits abgefallen waren.

Tabelle IV.

Pflanzenteil	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Gefundenes Alkaloid g	Alkaloidgehalt Proz.	Alkaloidgehalt in 100 Pflanzen g
Keimblätter . . .	3,0560	0,9008	0,0728	8,1	0,91
Hypokotyl. . . .	1,8560	0,5190	0,0255	4,9	0,32
Wurzel	11,6804	2,7118	0,0684	2,5	0,86
Samenrückstand .	4,8024	4,4008	0,0517	1,2	0,65
Ganze Pflanzen .	21,3948	8,5324	0,2184	—	2,74

Die Veränderung des Alkaloidgehalts in der Pflanze während der Entwicklung zeigen Tabellen V bis VII. Die Tabelle V betrifft den absoluten Alkaloidgehalt in 100 Pflanzen und den prozentualen Alkaloidgehalt in den ganzen Pflanzen, berechnet auf Trockensubstanz. Die Tabelle VI bringt den absoluten Alkaloidgehalt der einzelnen Teile von 100 Pflanzen, während Tabelle VII den auf Trockensubstanz berechneten prozentualen Alkaloidgehalt der Teile bringt.

Tabelle V.

Versuch	Alter der Pflanzen Tage	Anzahl der Pflanzen g	Trockengewicht g	Gefundenes Alkaloid g	Alkaloidgehalt berechnet auf 100 Pflanzen g	Alkaloidgehalt Proz.
	0	100	144,0000	3,1500	3,150	2,19
A . . .	47	10	12,0580	0,2221	2,221	1,83
B . . .	121	20	27,4690	0,7666	3,833	2,8
B . . .	163	8	8,5324	0,2184	2,74	2,6
A . . .	215	3	2,5686	0,1012	3,37	3,9

Tabelle VI.

Alkaloidgehalt der einzelnen Pflanzenteile, berechnet auf 100 Pflanzen.

Versuch	Alter der Pflanzen Tage	Samen und Samenrückstand	Wurzel	Hypokotyl und Stengel	Keimblätter und Blätter
	0	3,15	—	—	—
A . . .	47	2,11	0,12	—	—
B . . .	121	1,02	0,70	0,12	1,99
B . . .	163	0,65	0,86	0,32	0,91
A . . .	215	—	1,48	0,36	1,53

Tabelle VII.

Alkaloidgehalt der einzelnen Pflanzenteile, berechnet in Prozenten auf Trockengewicht.

Versuch	Alter der Pflanzen Tage	Samen und Samenrückstand	Wurzel	Hypokotyl und Stengel	Keimblätter und Blätter
	0	2,19	—	—	—
A . . .	47	1,8	3,9	—	—
B . . .	121	1,0	4,9	5,6	16,8
B . . .	163	1,2	2,5	4,9	8,1
A . . .	215	—	3,1	3,3	5,7

Autorenverzeichnis.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertachtundsechzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1926

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.

Über die synthetische Wirkung der pflanzlichen Proteasen.

Von

A. Blagowestschenski.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Kabinett der Mittelasiatischen Staatsuniversität, Taschkent.)

(Eingegangen am 14. Oktober 1925.)

Der einfachste mögliche Fall einer Synthese von Aminosäuremolekülen ist zweifellos die Bildung von heterozyklischen Verbindungen aus denselben, die dem Diketopiperazintypus angehören. Durch Ringspaltung der Piperazine entstehen verschiedene Dipeptide. Im Jahre 1915 fand *Maillard*[1]) eine einfache Methode zur Darstellung dieser Verbindungen, indem er die entsprechenden Aminosäuren mit wasserfreiem Glycerin bis zu 170 bis 175^0 erwärmte. Unter derartigen Bedingungen erhielt er Leucinimid und Cycloalanylalanin. Der Versuch, die Erwärmung durch Fermentwirkung zu ersetzen, wurde nach einigen Jahren von *Ravenna*[2]) unternommen, dem es auf diese Weise gelang, die Synthese eines Dipeptids durch Einwirkung von pflanzlichem Ferment auf Asparaginsäure zuwege zu bringen.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Wirkung von pflanzlichem proteoklastischem Ferment auf Aminosäuren in einem Glycerinmilieu. Als Fermentpräparat dienten Samen von Phaseolus Mungo L., die sich seit einigen Tagen im Keimungsstadium befanden. Sie wurden getrocknet und fein zerkleinert. 1 g des erhaltenen Pulvers wurde im Mörser in Anwesenheit von Toluol mit 20 g wasserfreien Glycerins (*Kahlbaum*) vermischt. Von dieser Mischung wurden zwei Portionen genommen, genau gewogen und nach *Sörensen* titriert. Es ergaben sich folgende Werte für den Gehalt an Aminostickstoff:

---

[1]) *Maillard*, Arch. de Chim., Ser. IX, **3**, 78 bis 120, 1915.

[2]) *Ravenna*, Atti Reale Acad. Lincei, Ser. V., **29**, 55 bis 58, 1920.

Ganze Mischung g	Aminostickstoff mg
1,6950	1,4
1,7000	1,4

Nach 3 Wochen wurden wiederum zwei Portionen entnommen, gewogen und titriert:

Ganze Mischung	Aminostickstoff	
	in der genommenen Probe	in 1,7000 g
g	mg	mg
2,3050	2,2	1,6
2,1750	1,9	1,5

Offenbar findet bei der Autolyse der Keimlinge von Phaseolus Mungo in Glycerin eine weitere Spaltung der Eiweißstoffe statt, die sich in einer Zunahme des Aminostickstoffgehalts äußert: jedes Gramm des Fermentpräparats enthielt bei Beginn des Experiments 4,1 mg Aminostickstoff und bei Beendigung desselben 4,6 mg.

Im folgenden Versuch wurde das Verhalten von Leucin allein in Glycerinlösung studiert: 1,2610 g dieser Verbindung (*Mercks* Präparat) wurden sorgfältig mit 23,0065 g Glycerin in Anwesenheit von Toluol zerrieben. Jedes Gramm dieser Mischung enthielt 0,0520 g Leucin und 0,0055 g Aminostickstoff. Titration nach *Sörensen* ergab bei Beginn des Versuchs und nach Verlauf von 3 Wochen folgende Werte:

Datum	Gewicht der Mischung	Aminostickstoff in g		
	g	in genommener Probe	in 2 g	
5. VIII.	1,9900	11,2	11,2	11,15
	2,0100	11,1	11,1	
27. VIII.	2,3900	13,3	11,2	11,2
	2,4100	13,6	11,2	

Aus den angeführten Daten ist klar zu ersehen, daß der Aminostickstoffgehalt unter diesen Bedingungen praktisch unverändert bleibt.

Ganz andere Resultate ergaben sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Leucin und pulverisierten aufgekeimten Samen von Phaseolus Mungo in der Glycerinlösung. Zu dem diesbezüglichen Versuch wurden 1,8810 g Leucin, 9,3530 g trockenes Pulver von den zerriebenen eintägigen Keimlingen und 40 g Glycerin genommen und alles sorgfältig vermischt. Jedes Gramm der Mischung enthielt 0,0367 g Leucin (0,0039 g Aminostickstoff) und 0,1827 g Fermentpräparat (bei Beginn des Versuchs waren 0,00075 g Aminostickstoff vorhanden, zum Schluß 0,00084 g). Der gesamte Aminostickstoff betrug in 1 g der Mischung bei Versuchsbeginn 4,65 mg, zum Schluß hätte er 4,74 mg betragen

müssen (unter der Bedingung, daß die Resultate der Orientierungsversuche ihre Geltung behielten). Tatsächlich ergaben sich folgende Zahlen:

Datum	Gewicht einer Probe g	Aminostickstoff in mg erhalten	in 2 g der Mischung erhalten		in 2 g der Mischung berechnet
5. VIII.	1,5500	7,1	9,2	9,05	9,3
	1,8450	8,2	8,9		
16. VIII.	2,1950	9,4	8,6	8,45	—
	2,5200	10,5	8,3		
28. VIII.	2,5000	10,5	8,4	8,3	9,5
	2,3700	9,7	8,2		

Somit betrug die Menge des Aminostickstoffs, die bei Beginn des Versuchs 97,3 Proz. der berechneten ausmachte, zum Schluß des Experiments nur noch 87,4 Proz.

In gleicher Weise ließ sich auch eine Abnahme der Menge des Aminostickstoffs bei zwei anderen Versuchen mit etwas abweichenden Verhältnissen von Ferment, Leucin und Glycerin beobachten. Im ersten Versuch wurden in Gegenwart von Toluol 4,094 g Leucin, 11,1000 g Fermentpräparat und 91,1500 g Glycerin sorgfältig miteinander vermischt. Die Dauer des Experiments war etwas länger als diejenige des vorhergehenden, nämlich 2½ Monate.

Datum	Gewicht einer Probe g	Aminostickstoff in mg in der Probe	in 3 g der Mischung	
8. IX.	2,4850	11,3	13,6	13,7
	2,3000	10,6	13,8	
10. X.	2,2550	9,2	12,2	12,2
	2,9900	12,2	12,2	
28. XI.	2,7720	10,2	11,0	10,95
	3,3550	12,2	10,9	

Im folgenden Versuch wurden in Anwesenheit von Toluol zusammengegeben: 2,8100 g Leucin, 8,51 g Fermentpräparat und 48,80 g Glycerin.

Datum	Gewicht einer Probe g	Aminostickstoff in mg in der Probe	in 2 g der Mischung	
9. IV.	1,4900	12,2	16,4	16,0
	2,1500	16,8	15,6	
18. IV.	3,6600	25,6	14,0	14,5
	4,6200	34,7	15,0	
14. V.	3,3650	24,8	14,6	14,65
	2,2450	16,5	14,7	

Um sich davon zu überzeugen, ob die beobachtete Abnahme der Aminostickstoffmenge durch die Bildung von Leucinimid verursacht

wurde, wurde der Versuch unternommen, diese Verbindung zu isolieren oder wenigstens ihre Anwesenheit vermittelst einer qualitativen Reaktion nachzuweisen. Ich bediente mich hierzu der gleichen Methode, wie sie *Maillard* in seiner Arbeit angewandt hatte. Die Glycerinlösung wurde filtriert, der Bodensatz auf dem Filter zweimal mit Äthylalkohol durchgewaschen und mit siedendem Alkohol extrahiert. Beim Abkühlen des Extrakts fiel ein kristallinischer Niederschlag aus, der in einer geringen Menge konzentrierter Schwefelsäure gelöst wurde. Die Lösung wurde in eine große Menge Wasser gegossen, dabei entstand ein flockenartiger Niederschlag, der sich langsam auf dem Boden des Gefäßes absetzte. Nach dem Stehenlassen über Nacht wurde die Fällung filtriert, mit Wasser ausgewaschen und in siedendem Alkohol gelöst. Nach dem Erkalten bildeten sich feine, nadelförmige Kriställchen, doch reichte ihre Menge zur Schmelzpunktsbestimmung nicht aus. Die Bedingungen der Gewinnung, die Löslichkeit und das Aussehen der Kristalle stimmten vollkommen überein mit den von *Maillard* für Leucinimid beschriebenen Daten.

Die zweite Reihe der Versuche wurde mit Glykokoll angestellt. Die Resultate entsprachen den mit Leucin erhaltenen Ergebnissen: Abnahme der Aminostickstoffmenge in nicht wässerigen Lösungen und Unveränderlichkeit in Gegenwart von 30 Proz. Wasser zeigten deutlich sowohl das Stattfinden einer synthetischen Reaktion, als auch die Bedingungen, unter denen letztere eintritt.

Zum ersten Versuch wurden 11,2900 g Glykokoll (*Kahlbaum*) genommen und mit Glycerin und 2,6000 g Pulver, das aus Phaseolus-Mungo-Samen gewonnen worden war, in Gegenwart von Toluol zerrieben. Im Kontrollversuch ohne Ferment blieb der Gehalt an Aminostickstoff sowohl bei Beginn des Experiments als auch nach 2½ Monaten vollkommen unverändert und betrug am 26. Dezember 64,0 mg, am 9. März 64,0 mg.

Ein ganz anderes Bild ergab sich in Anwesenheit von Ferment:

Datum	Gewicht einer Probe g	Aminostickstoff in mg		
		in der Probe	in 2 g der Mischung	
26. XII.	1,9000	62,7	66,1	65,4
	2,2250	72,0	64,7	
24. I.	4,4600	141,7	63,6	64,2
	3,0100	98,6	64,7	
9. II.	2,9300	91,6	62,4	62,6
	3,2350	101,4	62,7	
9. III.	4,5900	142,8	62,2	61,9
	2,0250	61,9	61,6	

Um den Einfluß des Wassers auf die synthetische Reaktion festzustellen, wurde in den folgenden Versuchen als Lösungsmittel nicht

wasserfreies, sondern 70proz. Glycerin angewandt. Bei 5 Wochen langem Stehen von Glykokoll in einem derartigen Lösungsmittel in Anwesenheit von Toluol (1,2 g Glykokoll auf 23,6 g 70proz. Glycerin) konnte nicht die geringste Veränderung wahrgenommen werden.

Datum	Gewicht einer Probe	Aminostickstoff in mg		
	g	in der Probe	in 3 g der Mischung	
7. II.	1,4600	12,3	25,2	25,2
	2,8300	23,9	25,2	
13. III.	4,4700	39,3	25,2	25,2
	3,000	25,2	25,2	

Beim Stehenlassen von Pulver, das aus getrockneten Phaseolus-Mungo-Keimlingen bereitet worden war (1,1510 g Pulver auf 33,7850 g 70proz. Glycerin), fand in dieser Lösung sogar eine kleine Zunahme des Gehalts an freien Aminogruppen der Aminosäuren statt:

Datum	Gewicht einer Probe	Aminostickstoff in mg		
	g	in der Probe	in 3 g der Mischung	
7. II.	2,7440	0,8	0,9	0,9
	2,8000	0,8	0,9	
13. III.	6,0700	2,0	0,98	1,01
	4,0000	1,4	1,04	

Eine ebensolche kleine Steigerung des Gehalts an Aminogruppen wurde beim Zusammengeben von 4,4 g Glykokoll, 4,95 g Samenpulver, 80,6 g 70proz. Glycerin und Toluol beobachtet.

Datum	Gewicht einer Probe	Aminostickstoff in mg	
	g	in der Probe	in 3 g der Mischung
7. II.	3,3100	27,2	24,6
	3,5700	29,4	
13. III.	4,5500	37,8	25,0
	3,0000	25,1	

Aus allen angeführten Versuchen läßt sich somit der Schluß ziehen, daß bei der Einwirkung von Proteasen auf Aminosäuren eine Synthese von Produkten stattfinden kann, die den Diketopiperazinen ähnliche Eigenschaften aufweisen. Es ist durchaus denkbar, daß eine ähnliche Synthese während der ersten Stadien des Eiweißaufbaues in den Pflanzen statthat.

Über den Einfluß hoher Konzentrationen neutraler Stoffe auf die Wirkung der Peptase.

Von

A. Blagowestschenski.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Kabinett der Mittelasiatischen Staatsuniversität, Taschkent.)

(Eingegangen am 14. Oktober 1925.)

Im Jahre 1881 war von *C. Voit*[1]) folgendes gezeigt worden: Ein fleischfressendes Tier, dem zu seiner Nahrung Kohlenhydrate hinzugefügt werden, kann sich nicht nur im Stickstoffgleichgewicht erhalten, sondern auch seinen Reichtum an Eiweißstoffen vermehren, wenn so viel Fleisch in der Nahrung vorhanden ist, daß es an sich nicht ausreichend ist und bei Abwesenheit von Kohlenhydraten einen Eiweißverlust im Organismus hervorrufen würde. Somit wird das Nahrungseiweiß vom Organismus aufgespart, und die Größe dieser Reserve beträgt im Durchschnitt 9 Proz. des Eiweißes, das vorher ohne Zusatz von Kohlenhydraten gegeben wurde. Infolge dieser Fähigkeit der Kohlenhydrate, Eiweiß zu erhalten, setzen nach der Ansicht *Voits* die Grasfresser, die gewöhnlich bedeutende Mengen von Kohlenhydraten in ihrer Nahrung zu sich nehmen, in ihren Geweben leicht Eiweiß an. In neuester Zeit ist *Voits* Arbeit durch *Atwater*[2]) einer Prüfung unterworfen worden, die zu denselben Ergebnissen führte. Doch haben weder *Voit* noch *Atwater* die Frage nach der Ursache einer solchen Eiweißaufspeicherung bei Anwesenheit von Kohlenhydraten berührt, und es ist das Verdienst *Ringers*[3]), die Frage nach der Art und Weise, wie das Eiweiß erhalten wird, aufgeworfen zu haben. Nach *Ringer* geschieht dies durch die Wirkung der Kohlenhydrate auf die Zellfermente. Der Anschauung *Ringers* hat sich 1914 auch *Schaffer*[4]) angeschlossen, der in einer Reihe von Versuchen zeigen konnte, daß ein Zusatz von 1proz.

[1]) *C. Voit*, Hermanns Handb. d. Physiol. **6**, 143, 1881.
[2]) *W. O. Atwater*, Ergebn. d. Physiol. **8**, (1), 497, 1914.
[3]) *Ringer*, Journ. of biol. Chem. **12**, 437, 1912.
[4]) *P. A. Schaffer*, ebendaselbst **17**, 42 bis 43, 1914.

Glucose zu zerkleinerter, der Autolyse unterworfener Hundeleber unter im übrigen gleichen Bedingungen die Wirkung des proteoklastischen Ferments hemmt. Mit diesen Angaben ist die mir zugängliche Literatur über diesen Gegenstand erschöpft, und es erschien mir von Bedeutung zu sein, den Einfluß von Zucker auf eines der aktiven Elemente der im Darme vor sich gehenden Verdauung, nämlich auf die zu den Bestandteilen des Pankreatins gehörende Peptase zu untersuchen.

Die Methodik dieser Versuche war eine höchst einfache: Zu Peptonlösungen wurde Pankreatin und der eine oder andere der zu untersuchenden Stoffe, sowie Chloroform und Toluol hinzugefügt. Der Grad der Hydrolyse wurde durch Titration nach *Sörensen* bestimmt.

Vorhergehende Untersuchungen hatten gezeigt, daß sich die peptoklastische Wirkung des Pankreatins auch bei schwach saurer Reaktion des Peptons äußert. In zwei Kolben wurden je 30 ccm einer 4proz. Peptonlösung gebracht, darauf zu der einen 20 ccm Wasser, zur anderen 10 ccm einer 2proz. Pankreatinlösung und 10 ccm Wasser hinzugefügt. Im dritten Kolben befanden sich 40 ccm Wasser und 10 ccm Pankreatinlösung. Während des Versuchs blieb die Temperatur konstant auf 18°. Zur Bestimmung wurden 10 ccm entnommen.

Tabelle I.

Stundenzahl seit Beginn des Versuchs	Aminostickstoff in mg in 10 ccm		
	Pepton + Wasser	Pepton + Ferment	Ferment + Wasser
0	3,6	4,1	1,0
24	3,6	7,7	1,1
45	3,5	8,5	1,2
93	3,7	9,1	1,2
141	3,6	9,2	1,1
Veränderung:	0	+ 5,1	+ 0,1

Der Säuregrad der Lösung „Pepton + Ferment“ wurde durch Titration mit Phenolphthalein als Indikator als n/125[1]) ermittelt, d. h. ein Säuregehalt, bei dem die proteoklastische Wirkung des Pankreatins nicht mehr zutage tritt. Man muß offenbar annehmen, daß die pepto- und proteoklastischen Wirkungen durch verschiedene Fermente hervorgerufen werden. Zugunsten dieser Annahme spricht auch die von *Schaeffer* und *Terroine*[2]) und *Zunz*[3]) beobachtete Tat-

[1]) Leider war es mir nicht möglich, die p_H zu bestimmen, da in meinem Laboratorium in Taschkent während der Ausführung dieser Versuche (1923) die dazu erforderlichen Einrichtungen fehlten.

[2]) *G. Schaeffer* und *E. F. Terroine*, Journ. de Physiol. et Pathol. gén. **12**, 884 bis 905, 1910.

[3]) *E. Zunz*, Arch. intern. de Physiol. **11**, 191, 1912.

sache, daß der den echten Eiweißstoffen (Eieralbumin, Zein usw.) gegenüber vollkommen unwirksame, durch Enterokinase nicht aktivierte Pankreassaft eine deutliche ereptische Wirkung ausübt, indem er Peptone, Alanylglycin und Casein spaltet. Auf Grund der Tatsache, daß sich die Wirkung des Ferments auch ohne Zusatz von Lauge äußert, ist bei den folgenden Versuchen überall die natürliche Reaktion der Lösung beibehalten worden.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Zusätzen auf die Wirkung der Fermente wurde mit Rohrzucker begonnen. Wir nahmen drei Kolben. In jeden kamen 30 ccm einer 4proz. Peptonlösung, 10 ccm einer 2proz. Fermentlösung und 10 ccm Wasser. Zu dem einen Kolben wurden 5 g Rohrzucker hinzugefügt, zum zweiten 10 g, der dritte Kolben blieb ohne Zusatz. In den Proben, die unmittelbar darauf sowie nach Verlauf von 24, 43, 91 und 141 Stunden entnommen wurden, fanden sich folgende Mengen von Aminostickstoff in Milligrammen (Tabelle II).

Somit äußerte sich bei einer Saccharosekonzentration von 20 Proz. deren Wirkung zu Beginn des Reaktionsverlaufs in einer deutlichen Verlangsamung der Loslösung der Aminogruppen. 10 Proz. Saccharose zeigten keinen derartigen Einfluß. Das Endergebnis war in allen drei Fällen dasselbe.

Tabelle II.

Stundenzahl seit Beginn des Versuchs	Aminostickstoff in mg in 10 ccm		
	ohne Saccharose	5 g Saccharose	10 g Saccharose
0	4,1	4,1	3,9
24	7,7	7,6	6,4
Veränderung	+ 3,6	+ 3,5	+ 2,5
43	8,5	8,3	7,4
Veränderung	+ 0,8	+ 0,7	+ 1,0
91	9,1	8,8	8,4
Veränderung	+ 0,6	+ 0,5	+ 1,0
141	9,2	9,1	8,7
Veränderung	+ 0,1	+ 0,3	+ 0,3
Gesamtveränderung	+ 5,1	+ 5,0	+ 4,8

Der folgende Versuch zeigt, daß ein Zusatz von Rohrzucker und Glycerin in nicht hohen Konzentrationen gar keinen Einfluß auf den Hydrolysegrad des Peptons durch Pankreatin ausübt. In 11 Kolben wurden gebracht: Je 20 ccm einer 4proz. Peptonlösung, Chloroform und Toluol; ferner die in der Tabelle III angegebenen Mischungen zugefügt und schließlich zu jedem Kolben 10 ccm Fermentlösung zugesetzt. Die Dauer des Versuchs betrug nur 48 Stunden, was sich bis zu einem gewissen Grade bemerkbar machte (s. Tabelle III).

Weshalb sich in dieser Versuchsreihe keine Abnahme der Aktivität für die Konzentration des Rohrzuckers, die 20 Proz. beträgt, zeigt, ist unklar, um so mehr, als in dem folgenden Versuch ein derartiges

Sinken wieder auftritt. In diesem Falle war die Aufgabe gestellt, den Einfluß der höheren Konzentrationen zu studieren. Zu diesem Zwecke wurden 12 Kolben genommen und in jeden 5 ccm Peptonlösung, 0,1 g Pankreatin und 15 ccm eines Lösungsmittels von veränderlicher Kon-

Tabelle III.

Nr.	Lösungsmittel	Aminostickstoff in mg					
		27. IV.	28. IV.	Veränderung	29. IV.	Veränderung	Gesamtveränderung
1	10 ccm Wasser	4,0	7,1	+ 3,1	7,8	+ 0,7	+ 3,8
2	10 „ 80 proz Saccharoselösung	4,0	7,1	+ 3,1	7,7	+ 0,6	+ 3,7
3	8 ccm 80 proz. Saccharoselösung + 2 ccm Wasser	4,0	7,1	+ 3,1	7,8	+ 0,7	+ 3,8
4	6 ccm 80 proz. Saccharoselösung + 4 ccm Wasser	4,0	7,1	+ 3,1	7,8	+ 0,7	+ 3,8
5	4 ccm Saccharoselösung + 6 ccm Wasser	4,0	7,1	+ 3,1	7,8	+ 0,7	+ 3,8
6	2 ccm Saccharoselösung + 8 ccm Wasser	4,0	7,1	+ 3,1	7,8	+ 0,7	+ 3,8
7	10 ccm Glycerin	4,0	6,9	+ 2,9	7,4	+ 0,5	+ 3,4
8	8 „ „ + 2 ccm Wasser	4,0	7,0	+ 3,0	7,6	+ 0,6	+ 3,6
9	6 ccm Glycerin + 4 ccm Wasser	4,0	7,0	+ 3,0	7,4	+ 0,4	+ 3,4
10	4 ccm Glycerin + 6 ccm Wasser	4,0	7,3	+ 3,3	7,7	+ 0,4	+ 3,7
11	2 ccm Glycerin + 8 ccm Wasser	4,0	7,3	+ 3,3	7,7	+ 0,4	+ 3,7

Tabelle IV.

Nr.	Lösungsmittel	Konzentration g-Mol.	Aminostickstoff in mg		
			Beginn	Ende	Veränderung
1	15 ccm Wasser	0	4,4	—	—
2	15 „ „	0	4,4	9,7	+ 5,3
3	15 „ 80 proz. Saccharoselösung	1,75	4,4	8,7	+ 4,3
4	12,5 ccm 80 proz. Saccharoselösung + 2,5 ccm Wasser	1,45	4,4	8,5	+ 4,1
5	10 ccm 80 proz. Saccharoselösung + 5 ccm Wasser	1,16	4,4	8,7	+ 4,3
6	5 ccm 80 proz. Saccharoselösung + 10 ccm Wasser	0,58	4,4	9,2	+ 4,8
7	2,5 ccm 80 proz. Saccharoselösung + 12,5 ccm Wasser	0,29	4,4	9,5	+ 5,1
8	15 ccm Glycerin	8,15	4,4	6,7	+ 2,3
9	12,5 ccm Glycerin + 2,5 ccm Wasser	6,79	4,4	7,0	+ 2,6
10	10 ccm Glycerin + 5 ccm Wasser	5,44	4,4	8,1	+ 3,7
11	7,5 „ „ + 7,5 „ „	4,07	4,4	8,7	+ 4,3
12	5 „ „ + 10 „ „	2,72	4,4	9,0	+ 4,6

zentration eingeführt. Nach 24 Stunden wurde der ganze Inhalt jedes Kolbens nach *Sörensen* mit Formalin behandelt und die freien Aminogruppen bestimmt. Ein Kolben wurde zu Beginn des Versuchs titriert (s. Tabelle IV).

Sowohl Saccharose als auch Glycerin üben in hohen Konzentrationen eine stark hemmende Wirkung auf die Spaltung von Pepton durch Pankreatin aus, die für eine 8,15 grammolekulare Glycerinlösung 50 Proz. gegenüber der normalen Leistung des Ferments in Wasser erreicht.

Eine ähnliche herabsetzende Wirkung wurde für Methyl- und Äthylalkohol festgestellt. Der Versuch dauerte 25 Stunden bei 22°. In jeden Kolben wurden 5 ccm einer 4proz. Peptonlösung, 15 ccm Alkohol von wechselnder Stärke, 0,1 g Pankreatin, Chloroform und Toluol eingeführt.

Tabelle V.

	Alkohol g-Mol.	Aminostickstoff in mg		
		Beginn	Ende	Veränderung
Methylalkohol . . .	23,4	4,4	5,9	+ 1,5
„ . . .	15,6	4,4	6,6	+ 2,2
„ . . .	7,8	4,4	8,0	+ 3,6
„ . . .	3,1	4,4	8,5	+ 4,1
Wasser	—	4,4	8,4	+ 4,0
Äthylalkohol	16,3	4,4	7,0	+ 2,6
„	10,8	4,4	7,7	+ 3,3
„	5,4	4,4	8,3	+ 3,9
„	2,2	4,4	8,7	+ 4,3

Wie aus den angeführten Zahlen ersichtlich ist, üben beide Alkohole in hohen Konzentrationen eine stark hemmende Wirkung aus, in schwachen läßt sich jedoch sogar eine gewisse Stimulation wahrnehmen.

In verschiedenen Konzentrationen zur reagierenden Mischung hinzugefügt, verhindert Aceton die Spaltung des Peptons in genau der gleichen Weise wie die übrigen untersuchten Stoffe. Die Versuchsbedingungen sind dieselben: 5 ccm Peptonlösung, 0,1 g Pankreatin und 20 ccm Aceton von verschiedener Stärke. Dauer des Versuchs 26 Stunden.

Tabelle VI.

Aceton g-Mol.	Aminostickstoff in mg		
	Beginn	Ende	Veränderung
12,94	3,1	4,8	+ 1,7
10,78	3,1	5,3	+ 2,2
8,62	3,1	5,6	+ 2,5
6,47	3,1	7,6	+ 4,5
4,31	3,1	7,6	+ 4,5
0	3,1	10,5	+ 7,4

Die Gemeinsamkeit der Erscheinungen bei so verschiedenen Stoffen, wie Saccharose, Glycerin, Methyl- und Äthylalkohol sowie Aceton, legte den Gedanken nahe, daß sich auch anorganische neutrale Salze in derselben Weise verhalten werden. Es wurden Versuche mit NaCl und KNO_3 angestellt. Das Verhalten dieser beiden Salze erwies sich als ziemlich verschieden. Während NaCl völlig gesetzmäßige Reihen von Veränderungen ergibt, zeigt KNO_3 äußerst unbestimmte Resultate. Die Bedingungen der Versuche waren denjenigen der vorhergehenden gleich: 8proz. Peptonlösung, 0,1 g Pankreatin, das Gesamtvolumen der Lösung gleich 20 ccm, Chloroform, Toluol. Dauer des ersten Versuchs mit Natriumchlorid 24 Stunden bei 25°, des zweiten 44 Stunden (Tabelle VII).

Tabelle VII.

NaCl	Aminostickstoff in mg		
g-Mol.	Beginn	Ende	Veränderung
		A.	
6,0	9,3	9,4	+ 0,1
5,5	9,3	9,5	+ 0,2
5,0	9,3	9,5	+ 0,2
4,5	9,3	9,7	+ 0,4
4,0	9,3	9,9	+ 0,6
3,5	9,3	10,1	+ 0,8
3,0	9,3	10,4	+ 1,1
2,5	9,3	10,4	+ 1,1
2,0	9,3	10,5	+ 1,2
0	9,3	10,8	+ 1,5
		B.	
6,0	9,3	9,4	+ 0,1
5,0	9,3	9,5	+ 0,2
4,0	9,3	9,5	+ 0,2
3,0	9,3	10,5	+ 1,2
0	9,3	11,1	+ 1,8

Beim folgenden Versuch mit NaCl wurden genommen: 20 ccm 10proz. Peptonlösung, pulverisiertes NaCl, 0,1 g Pankreatin, Chloroform, Toluol, Temperatur 14°. Versuchsdauer 68 Stunden. Für jede Konzentration wurden zwei Kolben genommen. Um von der Fehlergröße eine Vorstellung zu geben, sind die Resultate der Titrationen in der Tabelle VIII vollständig wiedergegeben.

Beim letzten Versuch mit NaCl war die Konzentration des Pankreatins um das Vierfache vergrößert worden. Die Versuchsdauer betrug 70 Stunden.

Die Wirkung von Kaliumnitrat wurde in einem Versuch, der 44 Stunden bei einer Temperatur von 25° dauerte, verfolgt. Die Konzentration der Lösung überstieg nicht 3,0 g-Mol., daher sind die Veränderungen auch nicht sehr groß.

Tabelle VIII.

NaCl g-Mol.	n/10 NaOH ccm	Aminostickstoff in mg		
		Beginn	Ende	Veränderung
0 0	31,3 31,4	30,2	40,8	+ 10,6
1,0 1,0	31,3 31,2	30,2	40,7	+ 10,5
2,0 2,0	31,4 31,0	30,2	40,7	+ 10,5
2,5 2,5	30,8 31,2	30,2	40,3	+ 10,1
3,5 3,5	30,9 30,5	30,2	39,9	+ 9,7
4,0 4,0	30,6 30,2	30,2	39,5	+ 9,3

Tabelle IX.

NaCl g-Mol.	Aminostickstoff in mg			
	Beginn	Ende	Veränderung	
3,0	35,8	56,4	+ 20,6	+ 19,9
3,0	35,8	54,7	+ 18,9	
4,0	35,8	—	—	—
4,0	35,8	54,0	+ 18,2	+ 18,2
5,0	35,8	50,8	+ 15,0	+ 15,6
5,0	35,8	52,1	+ 16,3	
6,0	35,8	.48,2	+ 12,4	+ 13,6
6,0	35,8	50,0	+ 14,2	

Tabelle X.

KNO_3 g-Mol.	Aminostickstoff in mg		
	Beginn	Ende	Veränderung
3,0	9,3	10,8	+ 1,5
2,5	9,3	10,5	+ 1,2
2,0	9,3	10,9	+ 1,6
1,5	9,3	10,8	+ 1,5
1,0	9,3	10,8	+ 1,5
Wasser	9,3	11,1	+ 1,8

Bei näherer Betrachtung der Versuchsresultate steigt der Gedanke auf, daß zwischen der Konzentration des neutralen Zusatzes und dem Grade der Hemmung der Fermentwirkung ein bestimmter gesetzmäßiger Zusammenhang besteht.

Bezeichnen wir mit ε die hemmende Wirkung des Zusatzes, mit p die Konzentration des Zusatzes in Grammolekülen, mit k eine gewisse Konstante, so erweist es sich, daß sich die Versuchsresultate in völlig befriedigender Weise durch folgende Formel ausdrücken lassen:

$$\varepsilon = k\sqrt{p^3}.$$

Wirkung von Glycerin.

p	ε	$k=\frac{\varepsilon}{\sqrt{p^3}}$	$\varepsilon_1=0{,}00498\sqrt{p^3}$
8,15	3,0	0,004 95	3,2
6,79	2,7	0,005 46	2,5
5,44	1,6	0,004 53	1,7
4,07	1,0	0,004 36	1,1
2,72	0,7	0,005 60	0,6
Durchschnitt:		0,004 98	

Wirkung von Saccharose.

p	ε	$k=\frac{\varepsilon}{\sqrt{p^3}}$	$\varepsilon_1=0{,}00381\sqrt{p^3}$
1,75	1,0	0,002 15	1,7
1,45	1,2	0,003 39	1,3
1,16	1,0	0,003 95	1,0
0,58	0,5	0,005 59	0,3
0,29	0,2	0,003 99	0,1
Durchschnitt:		0,008 81	

Wirkung von NaCl.

p	ε	$k=\frac{\varepsilon}{\sqrt{p^3}}$	$\varepsilon_1=0{,}1011\sqrt{p^3}$
6,0	1,4	0,0757	1,5
5,5	1,3	0,1008	1,3
5,0	1,3	0,1160	1,1
4,5	1,1	0,1152	1,0
4,0	0,9	0,1125	0,8
3,5	0,7	0,1068	0,7
3,0	0,4	0,0770	0,5
2,5	0,4	0,1013	0,4
2,0	0,3	0,1060	0,3
Durchschnitt:		0,1011	

Auf Grund der angeführten Tatsachen kann man annehmen, daß „die eiweißersparende Wirkung der Kohlenhydrate“ offenbar nicht von irgendwelchen spezifischen Eigenschaften der Kohlenhydrate abhängt, sondern von den Veränderungen, welche hohe Konzentrationen der Zusätze in dem Reaktionsmilieu hervorrufen. Die Ursache der reaktionshemmenden Wirkung der neutralen Zusätze läßt sich vorläufig noch nicht ermitteln, doch wird vielleicht die aufgefundene Gesetzmäßigkeit, welche die Beziehungen zwischen der Konzentration der Beimischungen und der Größe der hemmenden Wirkung klarlegt, bei weiteren Untersuchungen auch diesem Problem zur Lösung verhelfen können.

Über die Löslichkeit der Aminosäuren bei variierter Wasserstoffzahl.

Von

Kingo Sano.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Aichi-Medizinischen Universität zu Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 13. August 1925.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Über die Löslichkeit der schwerlöslichen Aminosäuren unter verschiedenen Bedingungen liegen nur wenige systematische Untersuchungen in der Literatur vor. Die ersten experimentellen Untersuchungen von *Michaelis* und *Davidsohn* (I, 2) betrafen die Abhängigkeit der Löslichkeit der Aminosäuren vom p_H und stellten fest, daß das Löslichkeitsminimum mit dem isoelektrischen Punkt zusammenfällt. Eine quantitative Untersuchung der Löslichkeit bei wechselndem p_H wurde von ihnen nicht ausgeführt. Eine derartige Untersuchung liegt meines Wissens bisher nur von *Hitchcock* (III, 2) vor, welcher die Löslichkeit des Tyrosins bei wechselndem p_H untersuchte und die Theorie der Löslichkeit, welche von *Michaelis* (I, 1) entwickelt wurde, experimentell gut bestätigte. Diese Arbeit von *Hitchcock* wurde mir erst bekannt, nachdem meine experimentellen Arbeiten fast abgeschlossen waren, andere Angaben konnte ich nicht finden. Meine Untersuchungen erstrecken sich auf Leucin, Tyrosin und Cystin. Das Problem besteht in der Untersuchung der Löslichkeit dieser Körper bei wechselndem p_H, wobei das p_H der Lösung immer nur durch solche Säuren und Basen eingestellt wurde, welche mit der Aminosäure leichtlösliche Salze bilden. Die gesamte Salzkonzentration der Lösung wurde immer so gering gehalten, daß wir ohne merklichen Fehler alle Salze als vollständig dissoziiert annehmen konnten, oder daß wir im Sinne der Ionenaktivitätstheorie unter Annahme praktisch stets vollständiger Dissoziation aller Salze ohne merklichen Fehler annehmen konnten, daß die Konzentration aller gelösten Ionen gleich ihrer Aktivität war. Daß diese Annahmen für die Bedingungen unserer Versuche

innerhalb der Fehlergrenze erlaubt sind, wird durch einige besonders daraufhin angestellte Versuche nachgewiesen werden. Wir haben also in unseren Versuchen immer einen Bodenkörper von Aminosäure und infolgedessen eine gesättigte Lösung von undissoziierter Aminosäure, deren Konzentration vom p_H unabhängig ist, und außerdem gelöste Ionen dieser Aminosäure, welche je nach dem p_H Kationen oder Anionen sind, und deren Menge vom p_H abhängen muß. Unter solchen Versuchsbedingungen läßt sich die Theorie der Löslichkeit der gesamten Aminosäuren nach *Michaelis* (I, 1) in folgender Weise entwickeln.

Befindet sich in der Lösung eine einbasische schwache Säure, so gilt nach dem Massenwirkungsgesetz die Beziehung

$$k = \frac{[\text{Säure-Anionen}] \,.\, [\text{H}^{\cdot}]}{[\text{undissoz. Säure}]} = \frac{S' \,.\, \text{H}^{\cdot}}{S} . \qquad (1)$$

Hier ist k die Dissoziationskonstante der Säure. Unter der Löslichkeit der festen Säure könnte man von vornherein zweierlei verstehen: entweder die Konzentration der Lösung an denjenigen Molekülen, welche als Bodenkörper vorhanden sind, also die Konzentration der gesättigten Lösung an undissoziierter Aminosäure. Dies wollen wir die partielle Löslichkeit λ nennen. Diese muß bei gegebener Temperatur eine Konstante sein. Streng genommen, braucht das nur zuzutreffen, wenn wir an Stelle der Konzentration die Aktivität setzen. Da es sich aber hier um eine undissoziierte Molekülart handelt, so können wir gewiß im Bereich unserer Untersuchungsgrenzen ohne merklichen Fehler die Konzentration gleich der Aktivität setzen, selbst wenn wir fast elektrolytfreie Lösungen mit salzreicheren vergleichen, und einige Versuche mit Zusatz von KCl werden das bestätigen. Zweitens können wir unter Löslichkeit der Säure diejenige Konzentration verstehen, welche die gesamten, in irgendwelcher Form gelösten Moleküle der Säure bei Gegenwart eines Bodenkörpers von freier Säure haben. Dies nennen wir die totale Löslichkeit Λ. Aus (1) folgt

$$\Lambda = \lambda + \frac{k \,.\, \lambda}{[\text{H}^{\cdot}]}$$

und daher

$$\frac{\Lambda}{\lambda} = 1 + \frac{k}{[\text{H}^{\cdot}]} . \qquad (2)$$

Wenn die Säure zweibasisch ist, kommen außerdem noch die Ionen der zweiten Dissoziationsstufe hinzu, deren Konzentration bestimmt wird durch

$$k_2 = \frac{S'' . \,[\text{H}^{\cdot}]}{S'} . \qquad (3)$$

Die gesamte Löslichkeit ist daher

$$\Lambda = \lambda + \frac{K_1}{[H^\cdot]}\lambda + \frac{K_2}{K_1}\left(\frac{K_1}{[H^\cdot]}\right)^2\lambda$$

$$\frac{\Lambda}{\lambda} = 1 + \frac{K_1}{[H^\cdot]} + \frac{K_2}{K_1}\left(\frac{K_1}{[H^\cdot]}\right)^2. \quad (4)$$

Für die Löslichkeit einer zweiwertigen Base gilt dasselbe, wenn wir $[OH']$ oder $\frac{K_w}{[H^\cdot]}$ statt $[H^\cdot]$ setzen. Bei den Ampholyten muß man beide Betrachtungen für Säuren und Basen gleichzeitig anstellen. Wenn aber das Produkt der Säuren- und Basenkonstante kleiner als etwa 10^{-16} ist, so ist die isoelektrische Zone so breit, daß man auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes allein die Theorie für Basen und auf der alkalischen Seite allein die Theorie für Säuren anwenden kann. Es gibt nur wenige Ampholyte, bei denen diese Bedingung nicht zutrifft. *Michaelis* hatte empirisch festgestellt, daß Ampholyte, bei welchen $K_a \cdot K_b$ bis nahezu an 10^{-14} heranreicht, nicht vorkommen, und *Bjerrum* (I, 3) hat theoretisch die Ursache hiervon gezeigt. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren ist das Konstantenprodukt so klein, daß man sie unbedenklich nach diesem Prinzip behandeln kann: bei saurer Reaktion folgen sie vollständig den Dissoziationsgesetzen der Basen, bei alkalischer Reaktion denen der Säuren, und in der sehr breiten isoelektrischen Zone sind sie praktisch überhaupt nicht dissoziiert, wobei es für die Theorie der Löslichkeit belanglos ist, ob die undissoziierten Moleküle gemäß der älteren Anschauung als unelektrische Moleküle oder gemäß der Anschauung von *Adams* (I, 4) und *Bjerrum* (I, 3) als Zwitterionen vorhanden sind.

Am leichtesten zu überblicken sind diejenigen Aminosäuren, welche sowohl als Säure wie als Base immer nur einwertig auftreten können. Dies trifft aus unserem Versuchsmaterial für das Leucin zu, und wir beginnen deshalb mit diesem.

1. Leucin.

Leucin (*Merck*) wurde aus heißem Wasser unter Zusatz von ziemlich viel Blutkohle umkristallisiert. Die Drehung, bestimmt an einer 4proz. Lösung in 20proz. HCl betrug:

$$[\alpha]_D^{15^0} = + \frac{100 \cdot 0{,}71}{1 \cdot 4} = + 17{,}75^0$$

(nach *Schulze* und *Winterstein* in demselben Lösungsmittel 17,3 bis 17,76⁰).

Ein reichlicher Überschuß von festem Leucin wurde in dem jeweiligen Lösungsmittel in einem Wasserbad von $25^0 \pm 0{,}1^0$ geschüttelt. Dann wurde die Flasche in einen Luftthermostaten von gleicher Temperatur gebracht, möglichst schnell durch ein vorgewärmtes

Asbestfilter abgesaugt und das Filtrat teils zur p_H-Messung, teils zur N-Bestimmung benutzt. Das p_H wurde mit der Wasserstoffelektrode im Luftthermostaten bei 25° gemessen, indem der Potentialunterschied gegen eine mit KCl gesättigte Kalomelelektrode bestimmt wurde, deren Potentialunterschied gegen eine Wasserstoffelektrode mit Standardacetatlösung täglich kontrolliert wurde. Das p_H des Standardacetats wurde = 4,62 angenommen. Der Stickstoff wurde mit der Mikrokjeldahlmethode unter jodometrischer Titration nach *Bang* bestimmt.

Zunächst wurde die Löslichkeit im isoelektrischen Punkt bestimmt. Dieser liegt auf Grund der Literaturangaben bei $p_H = 6{,}06$. Da eine ziemlich breite isoelektrische Zone besteht, kommt es nicht darauf an, daß dieses p_H sehr genau innegehalten wird. Wir werden sehen, daß zwischen p_H 5 und 7, ja beinahe zwischen 4 und 8, kein Unterschied der Löslichkeit besteht. Zur Herstellung des isoelektrischen p_H wurde das Leucin in einer Lösung geschüttelt, welche 0,01 Mole Essigsäure und 0,2 Mole Natriumacetat im Liter enthielt. Um festzustellen, welche Schüttelzeit zur Erreichung des Gleichgewichts erforderlich ist, wurde die Mischung einerseits aus der Zimmertemperatur direkt in das Wasserbad gebracht und geschüttelt, eine andere Probe wurde mit dem Bodenkörper einige Zeit auf 50° erwärmt, um eine für die definitive Temperatur übersättigte Lösung herzustellen, und erst dann in dem Wasserbade von 25° geschüttelt. Es zeigte sich, daß die auf diese zwei Weisen festgestellten Löslichkeiten erst übereinstimmten, wenn das Schütteln 1½ bis 2 Tage lang fortgesetzt wurde. Deshalb wurden alle Versuche länger als 36 Stunden geschüttelt. Das Ergebnis ist in Tabelle I und II zusammengestellt.

Die erste Spalte gibt die Zusammensetzung der Lösung an, in welcher der Körper geschüttelt wurde. Bei den Versuchen mit NaOH wurde CO_2-freie Lauge und jede Vorsichtsmaßregel zur Fernhaltung von CO_2 angewendet. Die zweite Spalte gibt das p_H des Filtrats. In der nächsten Spalte werden drei Parallelbestimmungen des N und in der letzten Spalte der Mittelwert in mg N pro Liter angegeben.

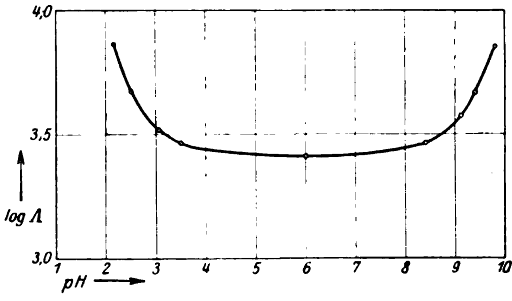


Abb. 1. Löslichkeit des Leucins. Abszisse: p_H. Ordinate: log A, wo A die mg N pro Liter bedeutet.

Die Resultate sind zunächst unmittelbar in Abb. 1 dargestellt. Als Minimum der Löslichkeit im isoelektrischen Punkt ergibt sich

N: 2,588 g } pro Liter
Leucin: 24,24 g } bei 25°.

Nach *E. Schulze* (II, 4) löst sich Leucin bei 22° in etwa 41 Teilen Wasser, d. h. 24,39 g pro Liter, und es soll die Löslichkeit nach der

Tabelle I.
(Leucin.)

Zusammensetzung der Lösung	p_H	N in 1 ccm Filtrat mg	N pro Liter (Mittelwert) mg
1. n/3 HCl . . .	2,15	7,325 7,353 7,340	7339
2. n/10 HCl . . .	2,49	4,737 4,709 4,710	4719
3. n/50 HCl . . .	3,07	3,290 3,304 3,300	3298
4. n/10 Essigsäure	3,51	2,938 2,850 2,967	2915
5. n/100 Essigsäure n/5 Na-Acetat	6,01	2,550 2,627 2,561	2588
	6,00	2,523 2,477 2,540	
	6,05	2,523 2,547 2,589	
6. n/200 NaOH .	8,36	2,939 2,865 2,889	2898
7. n/20 NaOH . .	9,12	3,783 3,713 3,731	3742
8. n/10 NgOH . .	9,41	4,678 4,649 4,650	4659
9. $^{3}/_{5}$n NaOH . .	9,81	7,154 7,098 7,158	7137

Die Analysenangaben sind alle nach Abzug des blinden N gemacht, welcher 0,05 mg betrug.

Tabelle II.
(Leucin.)

p_H	N pro Liter mg	log Λ	log Λ — log λ	p_H	N pro Liter mg	log Λ	log Λ — log λ
2,15	7339	3,869	0,452	8,36	2898	3,462	0,041
2,49	4719	3,674	0,261	9,12	3742	3,573	0,160
3,07	3298	3,518	0,105	9,41	4659	3,668	0,255
3,51	2915	3,465	0,052	9,81	7137	3,854	0,431
6,02	2588	3,413	0				

Reinheit des Präparats zwischen 1 : 37 und 1 : 45 Teilen Wasser schwanken. In anderer Weise sind die Resultate in Abb. 2 dargestellt. Hier ist die Abszisse das p_H, die Ordinate Λ/λ, und zwar in logarithmischem Maßstabe, um in Übereinstimmung zu bleiben mit der Dar-

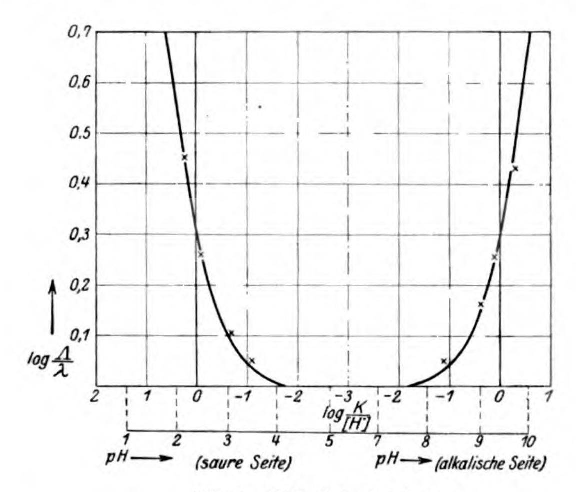


Abb. 2. Löslichkeit des Leucins.

Für die ausgezogene, theoretisch berechnete Kurve bedeutet

die Abszisse für die rechte Seite der Abbildung : $\log \frac{K_a}{[H^\cdot]}$ } obere Skala der Abszisse

für die linke Seite: $\log \frac{K_b \cdot [H^\cdot]}{K_w}$

die Ordinate für die rechte Seite: $\log \left(1 + \frac{K_a}{[H^\cdot]}\right)$

für die linke Seite: $\log \left(1 + \frac{K_b \cdot [H^\cdot]}{K_w}\right)$.

Für die experimentellen Punkte × bedeutet

die Abszisse : p_H (untere Skala der Abszisse), die Ordinate: $\log \frac{\Lambda}{\lambda}$.

stellung der weiter folgenden Aminosäuren, bei denen der direkte numerische Maßstab allzu unhandlich gewesen wäre. Die ausgezogene Kurve ist theoretisch berechnet, und zwar auf folgende Weise. Beginnen wir mit dem Schenkel auf der alkalischen Seite. Hier ist

$$\frac{\Lambda}{\lambda} = 1 + \frac{K_a}{[H^\cdot]}$$

$$\text{oder } \log \frac{\Lambda}{\lambda} = \log \left(1 + \frac{K_a}{[H^\cdot]}\right).$$

Λ/λ hängt also nur von dem Verhältnis $k_a : [H^\cdot]$ ab. Würde man dieses Verhältnis oder auch seinen Logarithmus als Ordinate nehmen, so wäre die Kurve für alle Säuren die gleiche. Eine solche Kurve mit

$\log \frac{K_a}{[H^\cdot]}$ als Abszisse und mit $\log\left(1 + \frac{K_a}{H^\cdot}\right) = \log \frac{\Lambda}{\lambda}$ als Ordinate wurde gemäß der Gleichung (2) entworfen, und es wurde ausprobiert, ob die Neigung dieser Kurve sich den beobachteten Punkten gut anpaßt, wenn $\log \Lambda/\lambda$ als Funktion von p_H aufgezeichnet wurde. Das war in der Tat der Fall. Nun wurde die theroetische Kurve auf das Diagramm des Experiments so aufgelegt, daß die Abszissen sich deckten und die beiden Kurven durch Horizontalverschiebung gegeneinander möglichst angeschmiegt waren. Betrachten wir jetzt einen einzelnen experimentellen Punkt, z. B. den am meisten rechts gelegenen, so sagt die theoretische Kurve aus, daß für diesen Punkt $\log \Lambda/\lambda = 0{,}43$, oder $\Lambda/\lambda = 2{,}70$ ist. Die direkte experimentelle Kurve sagt aus, daß dieser Punkt einem $p_H = 9{,}80$ oder $[H^\cdot] = 1{,}59 \,.\, 10^{-10}$ entspricht. Setzen wir diese Zahlenwerte in (2) ein, so ergibt sich

$$2{,}70 = 1 + \frac{k_a}{1{,}59 \,.\, 10^{-10}}.$$

Diese Gleichung können wir nach k_a auflösen. Wenn der auf diese Weise berechnete Wert von k_a für alle experimentellen Punkte übereinstimmt, so ist die Forderung der Theorie erfüllt. Zur Ausgleichung der experimentellen Fehler schieben wir statt dessen die Kurven so aufeinander, daß die Versuchsfehler gleichmäßig zu ihren beiden Seiten verteilt werden, und benutzen diese durch graphische Mittelung erhaltene Kurve zur Berechnung von k_a. Wir können jeden beliebigen Punkt dieser Kurve dazu benutzen, aber am einfachsten findet man k_a, wenn wir das p_H für die Ordinate 0,301 ablesen. Dieses p_H ist $= -\log k_a$. Wenn nämlich $[H^\cdot] = k_a$ ist, so ist

$$\log \frac{\Lambda}{\lambda} = \log\left(1 + \frac{K_a}{[H^\cdot]}\right) = \log 2 = 0{,}301.$$

Von den beobachteten Punkten fällt der unterste etwas aus der Kurve heraus. Wir dürfen ihm weniger Gewicht beilegen, denn erstens ist hier Λ nur wenig größer als λ, und Fehler der chemischen Analyse haben hier einen besonders großen Einfluß, zweitens handelt es sich um ein p_H-Gebiet, welches einer exakten Pufferung besondere Schwierigkeiten darbietet, wenn man die Pufferkonzentration nicht sehr groß nimmt, weil hier CO_2 als Pufferungsfehler besonders schwer ins Gewicht fällt. Auch der oberste Punkt zeigt eine kleine Abweichung, jedoch ist sie erträglich in Anbetracht des Umstandes, daß hier die Lösung schon einen Gehalt von 0,4 n an Na hat. Hiernach würde sich für Leucin bei 25° $p k_a = 9{,}50$ oder $k_a = 3{,}16 \,.\, 10^{-10}$ ergeben. Von *Winkelblech* (II, 5) wird $k_a = 1{,}8 \,.\, 10^{-10}$ angegeben. Der linke Ast der Kurve ist in entsprechender Weise gezeichnet. Aus ihm ergibt sich $\log k_b = \log k_w - 2{,}40 = 13{,}95 - 2{,}40 = 11{,}55$, $k_b = 2{,}82 \,.\, 10^{-12}$.

Von *Winkelblech* wurde gefunden $K_b = 2{,}3 \,.\, 10^{-12}$.

2. Tyrosin.

Die Untersuchung des Tyrosins ist deshalb komplizierter, weil es infolge der Phenolgruppe neben der Karboxylgruppe eine zweibasische Säure ist. Die Angaben über die Größe der beiden Säurekonstanten zeigen bei verschiedenen Autoren keine gute Übereinstimmung. Jedenfalls unterscheiden sich die beiden Säurekonstanten verhältnismäßig wenig voneinander, und in einem solchen Falle ist ihre exakte Bestimmung besonders schwierig, weil die Dissoziationskurven der ersten und zweiten Stufe stark miteinander interferieren. Dagegen ist die Basenkonstante leicht zu bestimmen.

Tyrosin (*Kahlbaum*) wurde aus heißem Wasser mit ziemlich viel Blutkohle umkristallisiert, die Drehung, gemessen in einer 3proz. Lösung, in 20proz. HCl, betrug:

$$[\alpha]_D^{15} = -\frac{100\,.\,0{,}27}{1\,.\,3} = -\;9{,}00^0$$

(nach *E. Fischer* in 21proz. HCl 7,98 bis 8,64°, stark steigend mit abnehmender HCl-Konzentration).

Die Löslichkeitsbestimmungen wurden in derselben Weise wie bei Leucin bei 25° ± 0,1° ausgeführt. Der isoelektrische Punkt des Tyrosins,

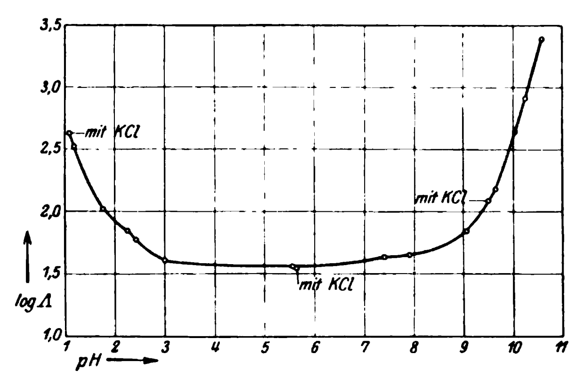


Abb. 3. Löslichkeit des Tyrosins. Bezeichnung wie in Abb. 1.

berechnet aus den in der Literatur vorliegenden Dissoziationskonstanten unter Vernachlässigung der zweiten Säurekonstante, liegt bei $p_H = 5{,}41$. Da das Produkt $k_a\,.\,k_b$ außerordentlich klein ist und die isoelektrische Zone sich über mehrere Einheiten von p_H erstreckt, können wir 5,41 zur Bestimmung des Löslichkeitsminimums benutzen, selbst wenn diese Zahl nicht sehr genau zutrifft. Denn aus Abb. 3 können wir ablesen, daß die Löslichkeit sich sogar zwischen $p_H = 3$ und 8 praktisch nicht ändert. Das Lösungsmittel zur Bestimmung des Löslichkeitsminimums war eine Lösung, welche 0,0125 Mole Essigsäure und 0,1 Mol Natriumacetat pro Liter enthielt. Wenn ein Überschuß von Tyrosin mit dieser

Lösung geschüttelt wurde, einmal ohne Vorbereitung direkt vom Zimmer in das Wasserbad von 25° übertragen, und ein zweites Mal, nachdem vorher durch Erhitzung auf 50° eine für 25° übersättigte Lösung hergestellt worden war, so zeigte sich, daß erst nach drei- bis viertägigem Schütteln die Löslichkeit in beiden Fällen gleich gefunden wurde. Die Unterschiede sind allerdings auch nach 2 Tagen nur noch klein, und insbesondere zeigte sich in anderen Versuchen, welche bei einem p_H außerhalb der isoelektrischen Zone angestellt wurden, daß das Gleichgewicht sich schneller einstellt. Jedenfalls wurden auch die Versuche außerhalb der isoelektrischen Zone stets etwas länger als 48 Stunden geschüttelt. Wegen der geringen Löslichkeit mußten zur Bestimmung des Löslichkeitsminimums 50 ccm des Filtrats zur N-Bestimmung benutzt werden. Das p_H wurde wie beim Leucin bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle III und IV wiedergegeben und aus ihnen die Tabelle VI berechnet.

Tabelle III. (Tyrosin, saure Seite.)

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	Volumen des untersuchten Filtrats ccm	N in diesem Volumen nach Korrektur des blinden N mg	N pro Liter mg	N pro Liter (Mittelwert) mg
1. n/10 HCl . .	1,17	10	3,407	340,70	340,70
		10	3,400	340,00	
		10	3,413	341,30	
2. n/50 HCl . .	1,74	20	2,487	124,40	124,60
		20	2,487	124,40	
		20	2,502	125,10	
3. n/100 HCl . .	2,25	20	1,405	70,25	70,08
		20	1,380	69,00	
		20	1,420	71,00	
4. n/Essigsäure .	2,39	25	1,507	60,29	60,56
		25	1,513	60,53	
		25	1,521	60,85	
5. n/10 Essigsäure	3,02	20	0,841	42,07	41,31
		20	0,827	41,36	
		20	0,820	41,79	
		20	0,836	41,01	
6. n/80 Essigsäure n/10 Na-Acetat	5,56	25	0,9184	36,74	36,58
		25	0,9043	36,18	
		25	0,8742	35,05	
	5,54	25	0,9482	37,92	
		25	0,9182	36,73	
		25	0,9044	36,18	
	5,57	50	1,844	36,88	
		50	1,816	36,32	
	5,58	50	1,844	36,88	
		50	1,844	36,88	

Das Löslichkeitsminimum beträgt

$$\left.\begin{array}{r}\text{N: } 0{,}03658\,\text{g} \\ \text{Tyrosin: } 0{,}4726\,\text{g}\end{array}\right\}\text{ pro Liter bei } 25^0.$$

Nach *Erlenmeyer* und *Lipp* löst sich ein Teil Tyrosin in 4291 Teilen Wasser von 17°, d. h. 0,4015 g pro Liter; nach *Hitchcock* 0,4745 g pro Liter bei 25°, praktisch genau mit meinem Befund übereinstimmend.

Tabelle IV.

(Tyrosin, alkalische Seite.)

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	Volumen d. untersuchten Filtrats ccm	N nach Korrektur des blinden N mg	N pro Liter mg	N pro Liter (Mittelwert) mg
1. n/80 Essigsäure, n/10 Na-Acetat . . .	5,56	—	—	—	36,58
2. m/30 sekund. Phosphat, m/400 prim. Phosphat	7,41	25	1,017	40,68	41,60
		25	1,059	42,36	
		25	1,048	41,80	
3. m/15 sekund. Phosphat	8,39	25	1,115	44,60	45,32
		25	1,141	45,64	
		25	1,143	45,72	
4. n/200 NaOH	9,04	20	1,423	71,15	70,22
		20	1,439	71,85	
		20	1,353	67,66	
5. n/100 NaOH	9,51	10	1,211	121,10	120,70
		10	1,241	124,10	
		10	1,169	116,90	
6. n/20 NaOH	10,07	10	4,407	440,70	442,60
		10	4,407	440,70	
		10	4,464	446,40	
7. n/10 NaOH	10,25	5	4,193	836,60	834,90
		5	4,193	836,60	
		5	4,137	827,40	
8. n/3 NaOH	10,55	5	12,592	251,90	244,20
		5	12,564	251,30	
		5	11,974	239,50	

Tabelle V.

(Löslichkeit des Tyrosins in 0,9 n KCl-Lösung.)

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	Volumen d. untersuchten Filtrats ccm	N nach Korrektur des blinden N mg	N pro Liter mg	N pro Liter (Mittelwert) mg
1. n/80 Essigsäure, n/10 Na-Acetat, 9/10 n KCl . . .	5,60	50	1,791	35,81	35,54
		50	1,763	35,26	
2. n/10 HCl, 9/10 n KCl	1,07	5	2,067	413,40	414,00
		5	2,073	414,60	
3. n/50 NaOH, 9/10 n KCl	9,63	5	0,749	152,40	151,10
		5	0,762	149,80	

Tabelle VI. (Tyrosin.)

p_H	N pro Liter mg	log Λ	log Λ — log λ	p_H	N pro Liter mg	log Λ	log Λ — log λ
1,07 mit KCl	414,00	2,617	1,054	7,41	41,61	1,619	0,056
1,17	340,70	2,532	0,969	8,39	45,32	1,656	0,093
1,74	124,60	2,096	0,533	9,04	70,22	1,846	0,283
2,25	70,08	1,846	0,283	9,51	120,70	2,082	0,519
2,39	60,56	1,783	0,220	9,63 mit KCl	151,10	2,179	0,616
3,02	41,31	1,616	0,053	10,07	442,60	2,640	1,183
5,56	36,58	1,563	0	10,25	834,90	2,922	1,356
5,60 mit KCl	35,54	1,551	0,012	10,55	244,20	3,388	1,825

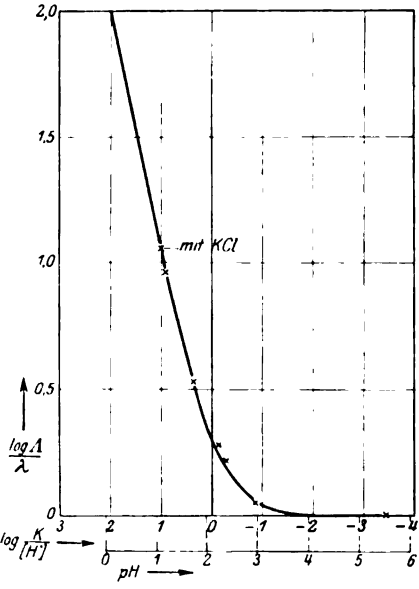


Abb. 4.
Löslichkeit des Tyrosins in saurer Lösung. Für die ausgezogene Kurve bedeutet die Abszisse: $\log \frac{K_b \cdot [H^\cdot]}{K_w}$ (obere Skala der Abszisse), die Ordinate: $\log \left(1 + \frac{K_b \cdot [H^\cdot]}{K_w}\right)$. Für die experimentellen Punkte bedeutet die Abszisse: p_H (untere Skala der Abszisse), die Ordinate: $\log \frac{\Lambda}{\lambda}$.

Betrachten wir die saure Seite der Versuche, so können wir sie theoretisch genau so wie bei Leucin behandeln. In Abb. 4 ist $\log \Lambda/\lambda$ als Funktion von p_H dargestellt und die theoretische Löslichkeitskurve für eine Base durch Horizontalverschiebung den experimentell bestimmten Punkten angeschmiegt. Wie man sieht, gelingt dies vollkommen, und die Theorie der Löslichkeit ist zunächst für saure Lösungen bestätigt. Die Basenkonstante finden wir wiederum, indem wir das p_H für die Ordinate 0,301 ablesen, es ist 2,15. Hieraus ergibt sich $pk_b = 13{,}95 - 2{,}15 = 11{,}80$ oder $k_b = 1{,}6 \cdot 10^{-12}$. *Kanitz* (II, 3) fand $2{,}6 \cdot 10^{-12}$, *Hitchcock* (II, 2) $1{,}57 \cdot 10^{-12}$.

Wenn wir nun zu der alkalischen Seite übergehen, so werden die Verhältnisse dadurch kompliziert, daß wir hier mit zwei aufeinanderfolgenden Säurekonstanten des Tyrosins rechnen müssen. Ich wendete folgendes graphische Verfahren an. Zunächst wurden die experimentell bestimmten Punkte für $\log \Lambda/\lambda$ als Funktion von p_H in Abb. 5 eingetragen. Nunmehr wurde die Löslichkeitskurve für eine beliebige einwertige Säure über derselben Abszisse konstruiert, und es wurde versucht, durch Horizontalverschiebung dieselbe der experimentellen

Kurve anzuschmiegen. Dies gelang aber nicht gut. Kurve I (Abb. 5) ist die theoretische Kurve. Sie hat deutlich eine andere Neigung als die experimentelle. Nunmehr wurde auf Grund von Formel (4) die theoretische Löslichkeitskurve für eine zweibasische Säure konstruiert, für welche $k_1 : k_2 = 5 : 1$ ist. (Kurve V, Abb. 5), ferner eine ebensolche für $k_1 : k_2 = 10 : 1$ (Kurve IV); 20 : 1 (Kurve III); 100 : 1 (Kurve II). Am besten gelang es, die Kurve III der experimentellen Kurve anzuschmiegen. Wir dürfen daher annehmen, daß innerhalb der Grenzen der mit dieser Methode erreichbaren Genauigkeit die beiden Säurekonstanten des Tyrosins sich wie 1 : 20 verhalten. Nunmehr handelt es sich um die Bestimmung der absoluten Größe dieser Konstanten. Wäre nur eine Konstante vorhanden, so würde uns wiederum der Abszissenwert für die Ordinate 0,301 direkt diese Konstante anzeigen. Für eine zweibasische Säure trifft das theoretisch streng nicht mehr zu. Nun bemerken wir aber, daß sämtliche theoretische Kurven von ihrem Anfang (links) eine ganze Strecke lang gleich verlaufen. Eine Divergenz der verschiedenen Kurven, welche die Fehlergrenzen der Messung überschreitet, macht sich erst bemerkbar, wenn die Kurven die Ordinate 0,5 oder sogar noch einen höheren Wert erreicht haben. Daraus folgt, daß wir zur Bestimmung der ersten Säurekonstante praktisch genau das frühere Verfahren anwenden dürfen, indem wir die Abszisse für die Ordinate 0,301 ablesen. Dann ergibt sich $pk_{a_1} = 9{,}10$ oder $k_{a_1} = 8 \cdot 10^{-10}$ und daher k_{a_2} ungefähr $= 4 \cdot 10^{-11}$.

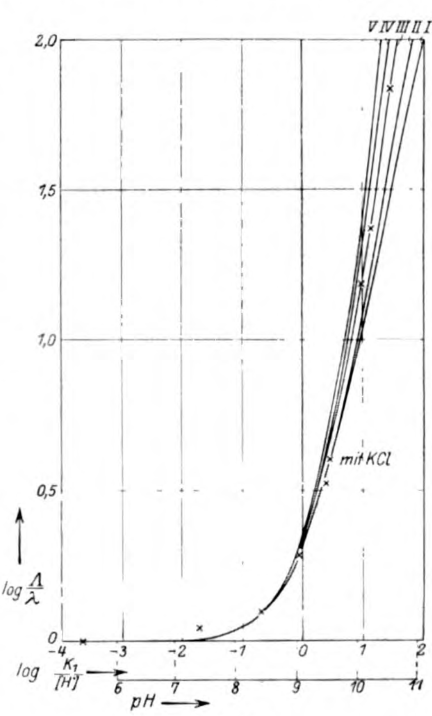


Abb. 5.
Löslichkeit des Tyrosins in alkalisch. Lösung. Für die fünf ausgezogenen Kurven bedeutet die Abszisse: $\log \frac{K_{a_1}}{[\mathrm{H}^\cdot]}$ (obere Skala), die Ordinate: $\log \left[1 + \frac{K_{a_1}}{[\mathrm{H}^\cdot]} + \frac{K_{a_2}}{K_{a_1}} \cdot \left(\frac{K_{a_1}}{[\mathrm{H}^\cdot]}\right)^2\right]$,

und zwar $\frac{K_{a_2}}{K_{a_1}} = 0$ für Kurve I,
$= 1/_{100}$ für Kurve II,
$= 1/_{20}$ für Kurve III,
$= 1/_{10}$ für Kurve IV,
$= 1/_{5}$ für Kurve V.

Für die experimentellen Punkte × bedeutet die Abszisse: p_{H}, die Ordinate: $\log \frac{\Lambda}{\lambda}$.

Die Angaben der verschiedenen Autoren sind folgende:

	k_{a_1}	k_{a_2}
Kanitz	4,0 . 10^{-9}	—
Harris	4,0 . 10^{-10}	4,0 . 10^{-11}
Hitchcock	7,8 . 10^{-10}	8,5 . 10^{-11}
Eigene Messung . . .	7,9 . 10^{-10}	4,0 . 10^{-11}

Bei Tyrosin wurden ferner einige Versuche über den Einfluß von Neutralsalzen auf die Löslichkeit gemacht.

Der Sinn dieser Versuche ist folgender. Die oben entwickelte Theorie der Löslichkeit gilt streng nur, wenn man überall die Aktivitäten statt der Konzentrationen der einzelnen Molekülarten einsetzt. Für die H-Ionen kennen wir nun stets nur die Aktivitäten, weil die H-Ionen elektrometrisch bestimmt sind. Die anderen Molekülarten aber messen wir in wahren Konzentrationen. Wenn nun der Gesamtgehalt der Lösung an gelösten Stoffen, besonders Elektrolyten, nicht als unendlich klein angesehen werden kann, können wir die Aktivitäten nicht gleich den Konzentrationen setzen. In der Formel (2) und (4) bedeuten nun Λ und λ Aktivitäten, während unsere Löslichkeitsbestimmungen mit Hilfe von chemischen Analysen die Konzentrationen geben. Für den Fall, daß der Einfluß der Salze auf die Aktivität der undissoziierten und der dissoziierten Moleküle der Aminosäuren der gleiche wäre, würde das Verhältnis $\Lambda : \lambda$ durch Salze überhaupt nicht beeinflußt werden. Dies wird nun streng gewiß nicht zutreffen, da die Aktivität unelektrischer Molekülarten durch Salze in der Regel weniger beeinflußt wird als die von Ionen. Aber es wird doch mit einiger Annäherung zutreffen, wenn die Gesamtsalzkonzentration nicht zu hoch ist und insbesondere, wenn keine Salze mit höherwertigen Ionen zugegen sind. Um zu zeigen, daß der Einfluß eines einwertigen Salzes selbst in mäßig hoher Konzentration keinen wesentlichen Fehler in den früheren, vereinfachten Ableitungen hervorruft, wurden einige Löslichkeitsbestimmungen bei Gegenwart von 0,9 Molen KCl pro Liter gemacht. Es zeigt sich, daß (Tabelle V, VI und Abb. 3, 4, 5) die bei einem bestimmten p_H mit und ohne KCl gefundenen Löslichkeiten praktisch gleich sind. Um so mehr dürfen wir annehmen, daß in den anderen Versuchen, wo nur die sehr geringen Salzmengen des Puffers vorhanden sind, diese Salze keinen sicher meßbaren Einfluß auf die Löslichkeit haben.

Wir dürfen daher im ganzen Bereich unseres Untersuchungsgebiets ohne erkennbaren Fehler die Unterscheidung von Aktivität und wahrer Konzentration vernachlässigen.

8. Cystin.

Das Cystin ist sowohl als Säure wie als Base zweiwertig. Angaben über seine Dissoziationskonstanten konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Es mußte deshalb mit einer angenäherten Bestimmung des isoelektrischen Punktes oder des Löslichkeitsminimums begonnen werden. Diese wurde nach dem Verfahren von *Michaelis* und *Davidsohn* (I, 2) ausgeführt durch Feststellung des Optimums der Kristallisation einer übersättigten Lösung bei variiertem p_H und konstantem Salzgehalt.

Das Cystin wurde zweimal umkristallisiert und 0,3 g in 10 ccm 0,5 n Natronlauge gelöst. Von dieser Lösung wurde je 1 ccm in die elf Mischungen der Tabelle eingefüllt, jedes Röhrchen sofort gut umgeschüttelt und die Kristallisation beobachtet. Diese beginnt in den mittleren Röhrchen der Reihe fast sofort und ergibt folgendes Bild,

Röhrchen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n/2 Essigsäure, ccm	1,25	1,5	3	6	—	—	—	—	—	—	—
8 n „ „	—	—	—	—	0,75	1,5	3	5	9	—	—
n/10 HCl . . . „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5,3	6
Dest. Wasser . „	7,75	7,5	6	3	8,25	7,5	6	4	0	3,7	3
n/2 NaOH mit Cystin . . . . „	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Trübungen	0	+	+	++	+++	+++	+++	++	++	0	0

wobei die Zahl der Kreuze den Grad der Trübung bedeutet. Die Ablesung geschah nach 3 Minuten. Der weitere Verlauf ist in der folgenden Tabelle angegeben, wobei die liegenden Kreuze eine sedimentierte Kristallisation bedeuten, die stehenden Kreuze eine diffuse Trübung. 0 bedeutet Klarheit der Lösung. Das Kristallisationsoptimum liegt also zwischen den Röhrchen 2 und 7. Es besteht also eine isoelektrische Zone etwa von p_H 3 bis 5. Der isoelektrische Punkt liegt also jedenfalls in der Gegend von $p_H = 4$. Diese Feststellung genügt in Anbetracht der Breite der isoelektrischen Zone, um eine geeignete Pufferlösung vorausbestimmen zu können, in welcher das Löslichkeitsminimum untersucht werden konnte.

Röhrchen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nach 5 Min.	×	××	××	×××	×××	×××	×××	××	××		0
„ 10 „	××	×××	××××	××××	××××	××××	××××	×××	××	+	0
„ 15 „	××	×××	××××	××××	××××	××××	××××	×××	××	×	0
„ 30 „	××	××××	××××	××××	××××	××××	××××	×××	××	×	0
p_H	5,65	5,05	4,50	3,85	3,55	3,20	2,91	2,75	2,60	2,40	2,23

Für die eigentlichen Versuche wurde das Cystin (*Kahlbaum*) folgendermaßen umkristallisiert. Es wurde in verdünntem Ammoniak gelöst, unter Zusatz von Blutkohle filtriert, und das Filtrat bei vermindertem Druck bis zur Kristallisation eingeengt. Nötigenfalls wurde ein Rest von Ammoniak

mit Essigsäure neutralisiert. Die Kristalle wurden mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Die Drehung betrug $[\alpha]_D^{15} = -\frac{100\,.\,1,03}{1\,.\,1} = -103^0$ 1proz. Lösung von Cystin in 1proz. Ammoniak (nach *Gaskell* — 97,5°). $[\alpha]_D^{15} = -\frac{100\,.\,2,18}{1\,.\,1} = -218^0$ 1proz. Lösung von Cystin in 20proz. HCl (die Angaben der Literatur schwanken von 205 bis 224°, siehe Biochemisches Handlexikon von *Abderhalden*).

Die Löslichkeitsbestimmungen wurden unter denselben Bedingungen wie bei den anderen Aminosäuren ausgeführt. Als Lösungsmittel zur Bestimmung des Löslichkeitsminimums wurde eine Lösung von 1 Mol Essigsäure und 0,2 Mol Natriumacetat im Liter benutzt. Vergleichende Versuche, bei denen die Sättigung direkt und andererseits nach vorheriger Übersättigung durch Erwärmen auf 50° angestrebt wurde, zeigten, daß erst nach 3 bis 4 Tage langem Schütteln das definitive Gleichgewicht eintrat. In Anbetracht des Umstandes, daß außerhalb des isoelektrischen Punktes die Sättigung schneller geschieht, wurden alle anderen Versuche mindestens 50 Stunden lang geschüttelt und dann in der früher beschriebenen Weise im Luftthermostaten von 25° schnell durch Asbest filtriert. Die Filtrate wurden einerseits zur Stickstoffbestimmung, andererseits zur p_H-Bestimmung benutzt. Die Wasserstoffelektrode erwies sich als ungeeignet für die p_H-Bestimmung. Dies war zu erwarten, weil Cystin leicht reduziert werden kann. Es stellt sich kein konstantes Potential ein. Dagegen gelang es ganz leicht, die p_H-Bestimmung mit der Chinhydronelektrode auszuführen, welche von *Bijlman* (I, 5) für diesen Zweck eingeführt wurde und mit großem Erfolg seitdem vielfach für diesen Zweck benutzt worden ist. Die Methode wurde in folgender Weise ausgeführt. Als Elektrodengefäß benutzte ich dasselbe wie für die Wasserstoffelektrode, die birnförmige Elektrode nach *Michaelis*, aber mit blankem, nicht platiniertem Platin. Das Platin wurde zur Entfernung etwaiger organischer Verunreinigungen der Oberfläche (Spuren von Fett) jedesmal vor dem Gebrauch ausgeglüht. Die zu untersuchende Flüssigkeit wurde mit etwas Chinhydron versetzt, bis die Lösung schwach gelb wurde, und dann in das Elektrodengefäß derart eingefüllt, daß der ganze Hohlraum desselben luftblasenfrei mit der Lösung ausgefüllt war.

Als Vergleichselektrode wurde eine ebensolche Chinhydronelektrode mit Standardacetatlösung benutzt, deren $p_H = 4,62$ angenommen wurde. Die beiden Elektroden wurden durch gesättigte KCl-Lösung verbunden. Die Messungen geschahen im Luftthermostaten bei 25°. Das Potential stellt sich sehr schnell ein und hält sich gut konstant. Leider ist dieses sehr bequeme Verfahren bei alkalischer Reaktion nicht brauchbar, weil das Hydrochinon, das eine Dissoziationsprodukt des Chinhydrons, bei alkalischer Reaktion meßbar

Tabelle VII. (Cystin, saure Seite.)

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	Volumen d. untersuchten Filtrats ccm	N nach Korrektur des blinden N mg	N pro Liter mg	N pro Liter (Mittelwert) mg
1. n/3 HCl	0,83	10	15,694	1569,40	1565,00
		10	15,578	1557,80	
		5	7,878	1575,70	
2. n/10 HCl	1,15	25	9,655	386,20	386,10
		25	9,627	385,20	
		25	9,669	386,80	
3. n/50 HCl	1,70	25	1,335	53,40	52,75
		25	1,321	52,85	
		25	1,300	52,00	
4. n/100 HCl	2,10	25	0,702	28,10	27,70
		25	0,700	28,10	
		25	0,672	26,90	
5. 5n Essigsäure, n/10 Na-Acetat . . .	2,99	25	0,317	12,70	13,10
		25	0,331	13,30	
		25	0,331	13,30	
6. n-Essigsäure, n/5 Na-Acetat . . .	3,77	25	0,317	12,70	12,78
		25	0,317	12,70	
		25	0,303	12,10	
	3,76	50	0,658	13,20	
		50	0,658	13,20	
		50	0,650	13,00	
	3,79	50	0,630	12,60	
		50	0,644	12,90	
		50	0,632	12,60	

Tabelle VIII. (Cystin, alkalische Seite.)

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	Volumen d. untersuchten Filtrats ccm	N nach Korrektur des blinden N mg	N pro Liter mg	N pro Liter (Mittelwert) mg
1. n/10 Essigsäure, n/10 Na-Acetat . . .	4,59	50	0,672	13,5	13,1
		50	0,644	12,9	
		50	0,644	12,9	
2. n/10 Essigsäure, 2n Na-Acetat . . .	5,88	25	0,331	13,3	13,5
		25	0,331	13,3	
		25	0,341	13,8	
3. m/30 sek. Phosphat, m/300 prim. Phosphat	7,52	25	0,492	19,7	19,3
		25	0,478	19,1	
		25	0,478	19,1	
4. m/30 sekund. Phosphat	7,98	25	0,685	27,4	27,6
		25	0,699	28,0	
		25	0,685	27,4	
5. m/200 NaOH	8,55	25	1,577	63,1	62,3
		25	1,563	62,5	
		25	1,535	61,4	
6. n/100 NaOH	8,78	10	1,008	100,8	101,7
		10	1,035	103,5	
		10	1,007	100,7	
7. n/50 NaOH	9,05	10	1,952	195,2	192,4
		10	1,938	193,8	
		10	1,882	188,2	
8. n/10 NaOH	9,85	5	7,318	1463,6	1459,0
		5	7,290	1458,0	
		5	7,276	1455,2	

elektrolytisch dissoziiert ist und die Voraussetzung, daß wir in Lösung gleiche Mengen von undissoziiertem Hydrochinon und Chinon, oder wenigstens ein genau angebbares Mengenverhältnis der beiden, vor uns haben, vereitelt. Für das alkalische Gebiet wendete ich deshalb das Verfahren mit einfarbigen Indikatoren der Nitrophenolreihe nach *Michaelis* (I. 6) mit Zuhilfenahme eines Komparators mit Blauscheibe an. Die Genauigkeit dieses Verfahrens kann wegen des etwaigen Salzfehlers nicht ganz so groß, aber doch nicht viel kleiner als bei der elektrometrischen Messung veranschlagt werden. Die Resultate sind in *Tabelle VII und VIII* verzeichnet, und aus den Mittelwerten ist die Tabelle IX angelegt. Diese Werte sind in den Diagrammen 6, 7 und 8

Tabelle IX. (Cystin.)

p_H	N pro Liter mg	log Λ	log Λ — log λ	p_H	N pro Liter mg	log Λ	log Λ — log λ
0,83	1568,00	3,195	2,088	5,88	13,5	1,130	0,023
1,15	386,10	2,587	1,480	7,52	19,3	1,286	0,215
1,70	52,70	1,723	0,616	7,98	32,1	1,441	0,334
2,10	27,70	1,443	0,336	8,55	62,3	1,795	0,688
2,99	13,10	1,117	0,010	8,78	101,7	2,007	0,900
3,78	12,78	1,107	0	9,05	192,4	2,284	1,177
4,59	13,10	1,117	0,010	9,85	1459,0	3,164	2,057

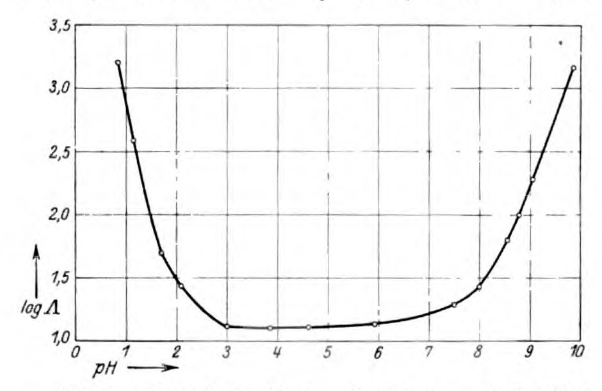


Abb. 6. Löslichkeit des Cystins. Bezeichnungen wie in Abb. 1.

aufgezeichnet. Das Löslichkeitsminimum des Cystins ergibt sich für 25° N-Gehalt 12,78 mg pro Liter, Cystin 0,1097 g pro Liter.

Nach *K. A. H. Mörner* (IV, 1) löst sich ein Teil Cystin in 9000 Teilen Wasser bei gewöhnlicher Temperatur, d. h. 0,111 g pro Liter.

Betrachten wir zunächst die saure Seite (Abb. 7). Es wurde wiederum eine theoretische Kurve konstruiert für eine einwertige Säure. Diese schmiegt sich der experimentellen Kurve, wie man sieht, durchaus nicht an. Von den anderen versuchsweise konstruierten theoretischen Kurven scheint sich am besten diejenige für $K_2 : K_1 = 1/4$

den beobachteten Punkten anzuschmiegen. Wenn wir nach dem früher geschilderten Verfahren die Dissoziationskonstanten bestimmen, so finden wir, daß in Abb. 7 die Ordinate 0,301 dem Abszissenpunkt

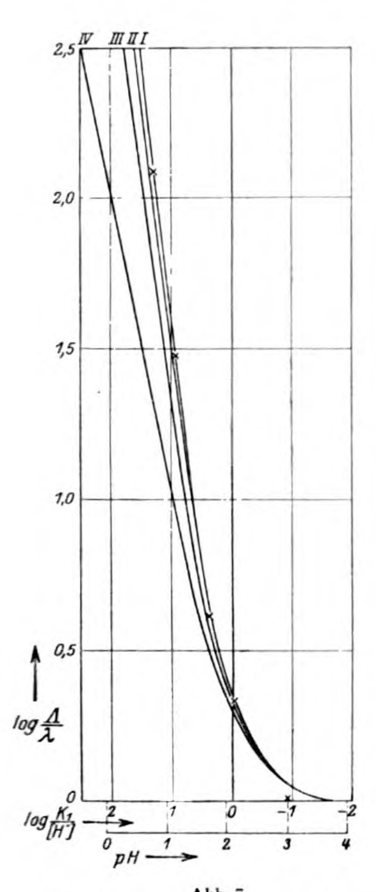


Abb. 7.
Löslichkeit des Cystins in saurer Lösung. Für die vier ausgezogenen Kurven bedeutet die Abszisse: $\log \frac{K_{b_1} \cdot [H^\cdot]}{K_w}$ (obere Skala), die Ordinate:

$$\log \left[1 + \frac{K_{b_1} \cdot [H^\cdot]}{K_w} + \frac{K_{b_2}}{K_{b_1}} \cdot \left(\frac{K_{b_1} \cdot [H^\cdot]}{K_w}\right)^2\right],$$

und zwar $\frac{K_{b_2}}{K_{b_1}} = 1/4$ für Kurve I,
$= 1/5$ für Kurve II,
$= 1/10$ für Kurve III,
$= 1/\infty$ für Kurve IV.
Für die experimentellen Punkte bedeutet die Abszisse: p_H, die Ordinate: $\log \frac{\Lambda}{\lambda}$.

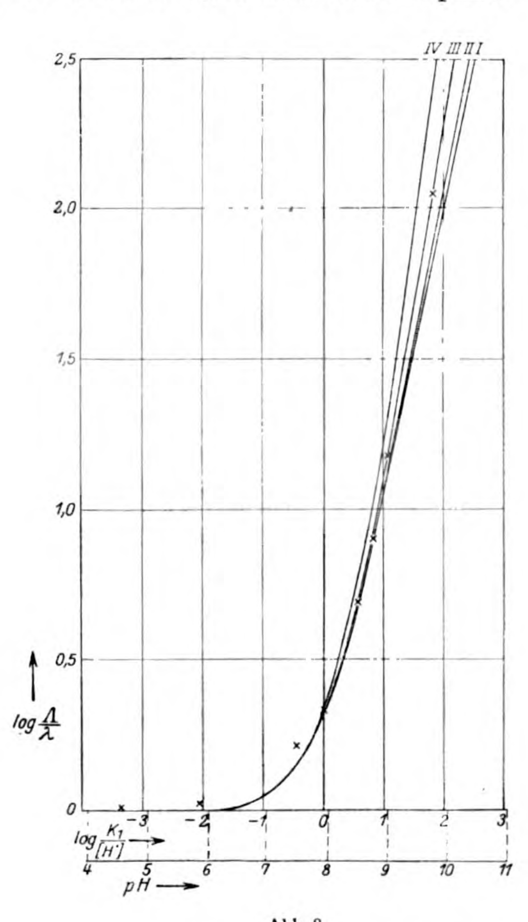


Abb. 8.
Löslichkeit des Cystins in alkalischer Lösung.

Bezeichnungen wie in Abb. 5.

$\frac{K_{a_2}}{K_{a_1}} = 1/\infty$ für Kurve I,
$= 1/1000$ für Kurve II,
$= 1/100$ für Kurve III,
$= 1/20$ für Kurve IV.

$p_H = 2{,}20$, d. h. $p_{OH} = 11{,}75$ entspricht. Das ergibt als erste Basenkonstante des Cystins $1{,}8 \cdot 10^{-12}$ und dementsprechend als zweite Konstante ungefähr $4{,}5 \cdot 10^{-13}$.

Betrachten wir jetzt die alkalische Seite, welche in der Abb. 8 dargestellt wird, so scheint sich am besten eine theoretische Kurve für $K_2/K_1 = {}^1/_{100}$ den experimentellen Beobachtungen anzuschließen. Als erste saure Dissoziationskonstante ergibt sich $p k_1 = 7{,}85$ oder $K_1 = 1{,}4 \cdot 10^{-8}$ und die zweite Säurekonstante kann man daher zu $1{,}4 \cdot 10^{-10}$ abschätzen.

In bezug auf die Bezeichnungsweise erste, zweite Säure- bzw. Basenkonstante ist noch zu bemerken, daß sie im Sinne der älteren Vorstellung gemacht sind, wonach jede durch p_H-Messung in alkalischer Lösung gewonnene Konstante als Säurekonstante, jede durch p_H-Messung in saurer Lösung gewonnene Konstante als Basenkonstante bezeichnet wird. Dazu liegt nach den oben zitierten Untersuchungen von *Bjerrum* heute kein Recht mehr vor. Da jedoch die Theorie der Löslichkeit von der veränderten Auffassungsweise über den Sinn dieser Konstanten nicht abhängt, so begnügen wir uns mit der Angabe der in dem älteren Sinne ausgedrückten scheinbaren Konstanten.

Zusammenfassung.

Es wird die Löslichkeit von Leucin, Tyrosin und Cystin bei 25° und variiertem p_H untersucht und die Theorie von *Michaelis* geprüft. Am einfachsten läßt sich die Theorie für Leucin bestätigen, welches sowohl als Säure wie als Base einwertig ist. Das Tyrosin ist als Säure zweiwertig, das Cystin sowohl als Säure wie als Base zweiwertig. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes wird die Theorie ebenfalls bestätigt. Zu diesem Zwecke hat man als Dissoziationskonstanten anzunehmen:

Für 25°		Leucin	Tyrosin	Cystin
Säurekonstante	1. Stufe	$K_a = 3{,}16 \cdot 10^{-10}$	$K_{a_1} = 7{,}94 \cdot 10^{-10}$	$K_{a_1} = 1{,}4 \cdot 10^{-8}$
	2. Stufe	—	$K_{a_2} = 7{,}94 \cdot 10^{-11}$	$K_{a_2} = 1{,}4 \cdot 10^{-10}$
Basenkonstante	1. Stufe	$K_b = 2{,}8 \cdot 10^{-12}$	$K_b = 1{,}6 \cdot 10^{-12}$	$K_{b_1} = 1{,}8 \cdot 10^{-12}$
	2. Stufe	—	—	$K_{b_2} = 4{,}5 \cdot 10^{-13}$

Literatur.

I. Allgemeines.

1) *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl., 1922. — 2) *L. Michaelis* und *H. Davidsohn*, diese Zeitschr. **30**, 140, 1910. — 3) *N. Bjerrum*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **104**, 147, 1923. — 4) *Q. Adams*, Journ. Amer. Chem. Soc. **38**, 1503, 1916. — 5) *Bijlman*, Festschr. d. Kgl. Univ. Kopenhagen 1920, S. 34; Transact. Faraday Soc. **19**, Nr. **54**, 1924. — 6) *L. Michaelis*, Praktikum der physik. Chem., 2. Aufl., 1922.

II. Über Leucin.

1) *B. Gmelin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 18, 24, 1894. — 2) *J. Haberman* und *R. Ehrenfeld*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 18 bis 28, 1902/03. — 3) *F. Embden*, ebendaselbst 43, 324, 1904/05. — 4) *E. Schulze*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 9, 253 bis 259, 1885, zitiert nach Biochemisches Handlexikon. — 5) *K. Winkelblech*, Zeitschr. f. physik. Chem. 36, 546, 1901. — 6) *L. J. Harris*, Reprinted from the Proceedings of the Royal Society B, 95, 1923. — 7) *Landolt* und *Börnstein*, Physikalisch-chemische Tabellen, 5. Aufl., 2, 1163.

III. Über Tyrosin.

1) *L. J. Harris*, The Proceedings of the Royal Society B, 95, 1923. — 2) *D. J. Hitchcock*, Journ. of Gener. Physiol. 6, Nr. 6, S. 747 bis 757, 1924. — 3) *Kanitz*, Arch. f. d. ges. Physiol. 118, 536, 1907. — 4) *Skraup* und *Hummelberger*, Monatsh. f. Chem. 29, 451, 1908. — 5) *Staedeler*, Ann. d. Chem. u. Pharm. 116, 64, 1860. — 6) *Weyl*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 246, 1910. — 7) *Stutzler*, Zeitschr. f. analyt. Chem. 31, 503, 1892. — 8) *Landolt* und *Börnstein*, Physikalisch-chemische Tabellen, 5. Aufl., 2, 1163; 3), 4), 5) und 7) zitiert nach Biochem. Handlexikon.

IV. Über Cystin.

1) *K. A. H. Mörner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 595 bis 615, 1899. — 2) *B. Mester*, ebendaselbst 14, 109, 1890. — 3) *C. Neuberg* und *P. Mayer*. ebendaselbst 44, 472 bis 492, 1905. — 4) *Wo. Lassaigne*, Ann. de Chim. et de Phys. (2) 23, 331; zitiert nach *Beilstein-Prager-Jacobson*, Organ. Chem,

Über die Vergärung der α-Ketoglutarsäure durch das Bacterium xylinum.

Von

Ryuzo Iwatsuru.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 5. Oktober 1925.)

Vor kurzem haben *C. Neuberg* und *F. Windisch*[1]) eine stark wirksame *Carboxylase* in den *Essigbakterien* aufgefunden. Das Vorkommen dieses Enzyms an dieser Stelle ist um so bemerkenswerter, als jene Mikroorganismen eigentlich nicht Zucker vergären, sondern auf die Verarbeitung des Alkohols angewiesen sind, der ihnen in der Natur von den wahren Erregern der geistigen Gärung zubereitet wird. Wie *Neuberg* des öfteren[2]) betont hat, kommt die universelle Bedeutung der Carboxylase darin zum Ausdruck, daß dieses Ferment auch solche Ketosäuren angreift, die sicherlich nicht bei der Spaltung des Zuckers auftreten, wohl aber sonst im Stoffwechsel von Bedeutung sind.

Neuberg und *Windisch* haben (l. c.) die carboxylatische Wirkung von Bacterium ascendens und xylinum auf die Brenztraubensäure sowie Oxalessigsäure festgestellt. Auf Anregung von *C. Neuberg* habe ich untersucht, ob das zur Gruppe der Essigbildner gehörige Bacterium xylinum Carboxylase enthält, die komplizierter gebaute α-Ketosäuren zu spalten vermag. Als eine solche wählte ich die *α-Ketoglutarsäure* und konnte nachweisen, daß diese verhältnismäßig glatt decarboxyliert und ganz in Analogie zu ihrer Umwandlung durch Hefencarboxylase[3]) in Bernsteinsäure übergeführt wird.

Damit ist gezeigt, daß eine in dem Essigsäurebakterium B. xylinum vorkommende Carboxylase gegenüber einer Ketosäure wirksam ist, die in keiner Beziehung zur Hauptfunktion des Erregers, zur Essigbildung, steht.

[1]) *C. Neuberg* und *F. Windisch*, diese Zeitschr. **166**, 454, 1925.
[2]) *C. Neuberg*, Der Zuckerumsatz der Zelle. S. 31, Jena 1913, und in C. Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., 2, 467, 1924.
[3]) *C. Neuberg* und *M. Ringer*, diese Zeitschr. **71**, 226, 1915.

Versuch 1.

2 g α-Ketoglutarsäure wurden in 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit 5 g Calciumcarbonat versetzt. Alle drei Materialien waren keimfrei. Hinzugegeben wurden 53,8 g einer sterilen Kultur von B. xylinum (= 5,55 g Trockenbakterien).

Nach dreitägiger Aufbewahrung im Brutschrank (bei 28°), während der wiederholt geschüttelt worden war, wurde filtriert. Der Schlamm von Kreide und Bakterienleibern wurde gründlich ausgewaschen. Das Filtrat wurde auf 30 ccm im *Faust-Heim*schen Verdunstungskasten eingeengt und ohne Rücksicht auf eingetretene Trübung mit starker Phosphorsäure bis zur sauren Reaktion gegenüber Kongo versetzt. Die nunmehr filtrierte Flüssigkeit wurde dann erschöpfend im Perkolator mit Äther extrahiert. Aus dem Äther schieden sich direkt 0,76 g Bernsteinsäure ab. Die Mutterlauge wurde verdampft. Es hinterblieb eine öldurchtränkte Kristallmasse, die auf Ton gestrichen wurde und noch 0,27 g Bernsteinsäure lieferte. Beide Portionen zeigten den Schmelzpunkt 181°. Die gesamte Ausbeute belief sich auf 1,03 g = 70 Proz. der Theorie.

0,1157 g Bernsteinsäure verbrauchten zur Neutralisation 19,5 ccm n/10 KOH, statt der berechneten 19,6 ccm.

Versuch 2.

1 g α-Ketoglutarsäure in 500 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung, 2,5 g kohlensaurer Kalk. Beimpfung mit 77 g frischer = 7,5 g trockener Masse von B. xylinum. Nach dreitägiger Aufbewahrung bei 28° und Aufarbeitung wie bei Versuch 1 wurden 0,24 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 182° gewonnen. Ausbeute: 30 Proz. der Theorie.

Versuch 3.

Gleichzeitig wurden 500 ccm physiologischer Kochsalzlösung mit 2,5 g Calciumcarbonat und 29 g frischen = 2,9 g trockenen Xylinumbakterien unter sterilen Bedingungen versetzt. Aufarbeitung nach 72 Stunden. Im ganzen wurde 0,01 g einer Säure erhalten, die bei 180° schmolz; es handelt sich um jene Spur Bernsteinsäure, die durch Autolyse der Bakterienleibessubstanz gebildet wird.

Wie schon *C. Neuberg* und *M. Ringer* (l. c.) gezeigt haben, ist α-Ketoglutarsäure in wässeriger Lösung beständig und gibt jedenfalls nicht zur freiwilligen Entstehung von Bernsteinsäure Anlaß. Die Ausschläge sind demnach so erheblich, daß an der Bildung von Bernsteinsäure aus α-Ketoglutarsäure bei carboxylatischer Wirkung des B. xylinum kein Zweifel möglich ist.

Über die Perhydridase des Kuhcolostrums und der Kuhmilch.

Von

D. Michlin.

(Aus der biochemischen Abteilung des Staatlichen Instituts für experimentelle Veterinärie in Moskau.)

(Eingegangen am 1. November 1925.)

Zur Untersuchung des oxydo-reduzierenden Ferments der Milch wird entweder die Methylenblau- oder die Nitratmethode angewandt. Erstere ist, wie bekannt, von *Schardinger* (1) in die Milchuntersuchung eingeführt worden. In der Milchpraxis, wo die *Schardinger*sche Reaktion sich als ein Verfahren für die Unterscheidung ungekochter Milch von gekochter eingebürgert hat, hält man für festgestellt (*Schardinger, Schern*), daß die frische rohe Kuhmilch innerhalb 10 bis 12 Minuten diese Reaktion auslösen müsse. Die Reaktion *Schardingers* hat hier nur eine qualitative Bedeutung, weswegen auch die Schwankungen der Reaktionszeit innerhalb dieser Grenzen nicht in Betracht gezogen werden. Für das theoretische Studium des *Schardinger*-Enzyms oder der Perhydridase verfügen wir dagegen über eine von *Bach* (2) angegebene quantitative Methode, nämlich über die exakte und außerordentlich empfindliche Nitratmethode. Diese Methode gestattet, geringste Enzymquantitäten zu bestimmen, welche mit der Methylenblaumethode unbestimmbar sind. In vorliegenden Untersuchungen benutzten wir daher die Methylenblaumethode in der Form, wie sie seinerzeit durch *Schardinger* vorgeschlagen wurde, nur für *qualitative Bestimmungen*. Alle quantitativen Bestimmungen des Enzyms wurden dagegen mit der *Bach*schen Nitratmethode ausgeführt. Folgende Fragen wurden ins Auge gefaßt:

1. Perhydridasegehalt des Colostrums, sowohl bei Kühen, die keinmal, wie bei denen, die mehrmals lactiert haben.

2. Perhydridasegehalt der Milch der frischmilchenden Kühe während des ersten Monats nach der Entbindung (im Zusammenhang

mit dem häufigen Ausbleiben der *Schardinger*-Reaktion bei derartiger Milch).

3. Veränderungen des Perhydridasegehalts der Milch altmilchender Kühe 1 bis 6 Monate nach der Entbindung.

4. Zusammenhang zwischen dem Fettgehalt und dem spezifischen Gewicht der Milch einerseits und ihrem Gehalt an Perhydridase andererseits.

Für unsere Untersuchungen wurden zwei Herden von 18 bzw. 19 Kühen während des Winters und Sommers 1925 in Beobachtung genommen. Während der Untersuchungen befanden sich die Kühe in einem hellen, warmen Stall und erhielten ein Futter, das aus bestimmten Mengen Heu, Kleie und Wurzelfrüchten bestand. Die beiden von uns untersuchten Herden gehörten zu einer Modellanstalt und dienten zu Unterrichts- und Musterzwecken, so daß ihr Gehalt streng reguliert wurde.

Kuhcolostrum.

Die Literaturangaben über den Gehalt an *Schardinger*-Enzym im Colostrum der Kühe sind, soweit wir wissen, sehr wenig zahlreich und einander widersprechend.

Gruber (3) hat das Enzym in der Colostralmilch der Kühe nicht aufgefunden. *Sassenhagen* (4) fand unbedeutende Mengen des Enzyms nur in den oberen Schichten. *Schern* (5) konnte in einigen Fällen das Enzym nachweisen, in anderen dagegen nicht. Sämtliche Angaben beruhen auf Ergebnissen *qualitativer*, mit Hilfe des *Schardinger*-Reagens ausgeführten Untersuchungen und beziehen sich auf die Colostralmilch, welche in den ersten Tagen nach der Entbindung gewonnen wird. Gänzlich unerforscht bleibt die Frage über den Gehalt an Perhydridase im eigentlichen Colostrum, d. h. in demjenigen Eutersekret der Kuh, welches während eines Intervalls zwischen zwei Lactationsperioden gebildet wird. Ferner fehlen, soweit wir wissen, auch alle Angaben über den Gehalt an Perhydridase im Brustdrüsensekret der erstmalig schwangeren Kuhkälber. Diese letzte Frage ist aber für die Physiologie der Perhydridase von Interesse. Nach den Arbeiten von *Trommsdorf* (6), welcher gezeigt hat, daß vollkommen sterile, unerwärmte Milch eine reduzierende Fähigkeit besitzt, kann als festgestellt betrachtet werden, daß das *Schardinger*-Enzym ein präformiertes Enzym ist, welches seine Existenz der sezernierenden Arbeit der Brustdrüse verdankt. Dabei entsteht aber die Frage, ob die Fermentbildung in der Milchdrüse durch eine bestimmte Entwicklung ihrer Lactationsfähigkeit bedingt ist, oder ob das Sezernieren der Milch und die Bildung der Perhydridase voneinander ganz unabhängige Prozesse im Euter darstellen. Zur Aufklärung dieser Frage scheint uns das Studium der Perhydridase im Brustdrüsensekret außerhalb der normalen Lactation geeignet zu sein. Das Colostrum der Tiere, die schon lactiert haben, stellt das Sekretionsprodukt der schon entwickelten Drüse dar, die jedoch, wahrscheinlich durch die Assimilationstätigkeit der Placenta, gehemmt wird [*Schein* (7)]. Die Euterausscheidungen der erstmalig schwangeren Kühe aber bilden

das Sekret einer noch niemals lactierten Drüse, die ihren vollständigen Entwicklungszustand noch niemals erreicht hat. Damit hängt es eben zusammen, daß die Zusammensetzung des Colostrums bei erstmalig schwangeren Kühen sich von der Zusammensetzung des Colostrums, welches im Intervall zwischen zwei Lactationsperioden und in den ersten Tagen nach der Entbindung genommen wird, unterscheidet. Für das Colostrum der Kühe, welches 5 Wochen vor der *ersten* Entbindung erhalten wurde, führt *König* (8) folgende Zahlen an: Wasser 72,0 Proz., Casein + Albumin 24,84 Proz., Fett 0,93 Proz. Für das unmittelbar nach der Entbindung gewonnene Colostrum fanden *Winterstein* und *Strickler* (9) Gesamteiweiß 9,13 Proz., Fett 2,4 Proz. Wir untersuchten das Colostrum der erstmalig schwangeren Kuh 4 Tage vor der Entbindung und fanden: Gesamteiweiß nach *Winterstein* und *Strickler* 18,76 Proz., das Fett nach *Gerber* 0,8 Proz.

In bezug auf Perhydridasegehalt unterscheidet sich das Colostrum der erstmalig schwangeren Kühe von dem der früher schon lactierten Kühe noch deutlicher. Wir hatten in unserer Beobachtung acht trockenstehende Kühe, deren Colostrum während der letzten 2 bis 6 Wochen des Trockenstehens untersucht wurde, und drei erstmalig schwangere Kühe, von welchen zwei während 4 bis 5 Monaten, die dritte aber während der letzten 2 Wochen vor der Entbindung in unserer Beobachtung sich befanden.

Unsere Untersuchungen beziehen sich auf frisches, nicht stagniertes Colostrum. Das im Euter stagnierende Colostrum der Kühe, die schon lactiert haben, wie auch solcher, die noch niemals lactierten, reduziert Nitrat zu Nitrit mit gleicher Energie. Wir aber führten unsere Untersuchungen mit dem Colostrum, welches nach einer vorausgehenden Entleerung des Euters gewonnen wurde.

Die Kühe wurden gemolken am Vorabend des Versuchstages. Am nächsten Morgen gewannen wir aus dem Euter das Colostrum zur quantitativen Bestimmung der Perhydridase. Von der auf diese Weise gewonnenen geringen Menge Colostrum wurde je 1 ccm in zwei Reagenzgläser gebracht. Eine der Proben wird aufgekocht; sie diente zur Kontrolle. In Fällen, wo sich bei dem Aufkochen ein Klümpchen bildete, wird es mit einem Glasstab zerrieben. Die aufgekochte Probe wurde bis auf Zimmertemperatur abgekühlt, und jedes Reagenzglas erhielt alsdann je 1 ccm 10proz. $NaNO_3$-Lösung und je 0,5 ccm 2proz. Acetaldehydlösung. Beide Reagenzgläser wurden bei 65° ins Wasserbad gestellt. Nach Verlauf einer halben Stunde wurden in jedes Reagenzglas je 2 ccm einer gesättigten Lösung von basischem Bleiacetat hinzugefügt (Eiweißfällung). Die Flüssigkeit wurde in graduierte Kolorimeterröhren abfiltriert und das Nitrit quantitativ nach *Lunge-Ilosvay* bestimmt. Die Menge des dabei gewonnenen Nitrits ist, wie *Bach* gezeigt hat, dem Fermentgehalt der zur Untersuchung genommenen Flüssigkeit (Colostrum) proportional.

Tabelle I.

1 ccm Colostrum liefert:

Kuh Nr. 1 kalbte zum dritten Male am 8. III. 1925.																
Datum . . .	22. II.	24. II.	26. II.	1. III.	3. III.	5. III.	7. III.	9. III.								
mg N_2O_3 . .	0,0036	0,0038	0,0040	0,0040	0,0039	0,0027	0,0019	0,0018								
Kuh Nr. 2 kalbte zum fünften Male am 2. V. 1925.																
Datum . . .	16.III.	19.III.	22.III.	25.III.	29.III.	2.IV.	4.IV.	6.IV.	10.IV.	12.IV.	15.IV.	17.IV.	20.IV.	25.IV.	30.IV.	3. V.
mg N_2O_3 . .	0,0029	0,0033	0,0035	0,0031	0,0037	0,0036	0,0039	0,0037	0,0038	0,0041	0,0044	0,0043	0,0042	0,0038	0,0031	0,0023
Kuh Nr. 4 kalbte zum fünften Male am 5. III. 1925.																
Datum . . .	22. II.	25. II.	1. III.	5. III.												
mg N_2O_3 . .	0,0024	0,0023	0,0021	0,0017												
Kuh Nr. 5 kalbte zum siebten Male am 3. III. 1925.																
Datum . . .	22. II.	24. II.	27. II.	1. III.	5. III.											
mg N_2O_3 . .	0,0028	0,0027	0,0026	0,0018	0,0021											
Kuh Nr. 7 kalbte zum vierten Male am 7. III. 1925.																
Datum . . .	22. II.	24. II.	26. II.	2. III.	4. III.	8. III.										
mg N_2O_3 . .	0,0027	0,0028	0,0027	0,0021	0,0017	0,0015										
Kuh Nr. 8 kalbte zum sechsten Male am 13. III. 1925.																
Datum . . .	22. II.	24. II.	26. II.	1. III.	4. III.	6. III.	9. III.	11.III.	14.III.							
mg N_2O_3 . .	0,0026	0,0026	0,0028	0,0027	0,0026	0,0027	0,0022	0,0020	0,0019							
Kuh Nr. 15 kalbte zum fünften Male am 12. VI. 1925.																
Datum . . .	21. V.	23. V.	26. V.	29. V.	2. VI.	5. VI.	7. VI.	9. VI.	11.VI.	12.VI.						
mg N_2O_3 . .	0,0023	0,0024	0,0028	0,0027	0,0030	0,0031	0,0027	0,0025	0,0020	0,0012						
Kuh Nr. 37 kalbte zum zweiten Male am 2. VI. 1925.																
Datum . . .	1. V.	8. V.	15. V.	23. V.	3. VI.											
mg N_2O_3 . .	0,0028	0,0036	0,0036	0,0029	0,0019											
Kuh Nr. 10 kalbte zum ersten Male am 2. III. 1925.																
Datum . . .	14. II. bis 23. II.			26. II.	28. II.	3. III.										
mg N_2O_3 . .	0			0,0006	0,0006	0,0008										
Kuh Nr. 13 kalbte zum ersten Male am 16. VII. 1925.																
Datum . . .	22. II. bis 23.VI.			26.VI.	30.VI.	8.VII.	16.VII.									
mg N_2O_3 . .	0			0,0006	0	0,0006	0,0010									
Kuh Nr. 17 kalbte zum ersten Male am 28. IX. 1925.																
Datum . . .	22.IV. bis 10.IX.															
mg N_2O_3 . .	0															

Wie aus der angeführten Tabelle ersichtlich ist, wird Nitrat durch das Colostrum der Kühe, die früher schon lactiert haben, stets energisch zu Nitrit reduziert. Mit der Annäherung des Entbindungstermins steigt der Perhydridasegehalt des Colostrums zuerst langsam an, sinkt aber nach Erreichen des Maximums allmählich wieder. Diese Abnahme besteht auch noch in der Colostralmilch in den ersten Tagen nach der Entbindung.

Ganz anders verhalten sich Ausscheidungen der Brustdrüse der erstmalig schwangeren Kühe. Während 4 bis 5 Monaten konnten wir bei zahlreichen Untersuchungen in ihnen nur ein einziges Mal minimale Perhydridasemengen auffinden. Während fast der ganzen Schwangerschaftsdauer fehlt das Ferment in den Ausscheidungen völlig; es erscheint erst 1 bis 2 Wochen vor der Entbindung.

Die Perhydridase der Milch frischmilchender Kühe.

Schardinger, welcher die Fähigkeit der frischen, ungekochten Milch, Methylenblau zu reduzieren, entdeckt hatte, schlug als Reagens zur Unterscheidung der gekochten Milch von der ungekochten, ein Gemisch von 5 ccm gesättigter Methylenblaualkohollösung, 5 ccm Formalin und 190 ccm Wasser vor. Abgesehen von den Widersprüchen in den Auffassungen des Mechanismus der *Schardinger*-Reaktion, wurde gegen ihre praktische Bedeutung kein Einwand erhoben. 1909 bemerkte jedoch *Schern*, daß die *Schardinger*-Reaktion in einigen Fällen sogar mit frischer, ungekochter Milch negativ ausfällt. Die Kuhmilch nämlich in den ersten 2 bis 8 Wochen nach der Entbindung (die sogenannte Frischmilch) bewirkt gar keine Entfärbung des *Schardinger*-Reagens oder bewirkt sie äußerst langsam. In *Königs* „Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel" und auch in der letzten Auflage des „Handbuchs der Biologischen Arbeitsmethoden" von *Abderhalden* (11) wird die *Schardinger*-Reaktion für ein unsicheres Mittel zur Unterscheidung der ungekochten Milch von der gekochten erklärt. Außer dieser praktischen Bedeutung der *Schardinger*-Reaktion hat aber die Milchperhydridase auch ein großes theoretisches Interesse. Von diesem Standpunkt aus ist es wünschenswert, mit Hilfe der *Bach*schen Nitratmethodik die Frage über das Vorhandensein der Perhydridase in der „Frischmilch" näher zu untersuchen.

Die Methylenblaumethode, wie sie in der Milchpraxis angewendet wird, ist für den Nachweis geringer Quantitäten des Enzyms in der Milch unbrauchbar. Auf den hemmenden Einfluß des Formaldehyds auf die Fermentwirkung hat schon *Schardinger* hingewiesen. Eingehender wurde die vergiftende Wirkung des Aldehyds auf die Perhydridase von *Bach* studiert. Bei höherem Fermentgehalt, welcher die Milch altmilchender Kühe charakterisiert, ist der Formaldehyd

nicht imstande, eine völlige Hemmung hervorzurufen, so daß die Reaktion mit der Methylenblaureduktion stets positive Erfolge ergibt. Bei geringeren Enzymmengen, die man in der Milch der frischmilchenden Kühe beobachtet, kann die hemmende Wirkung des Formaldehyds die vollständige Entfärbung des Methylenblaus verhindern. Wir ersetzten daher den Formaldehyd durch Acetaldehyd in dem *Schardinger*-Reagens. Das von uns angewandte Reagens enthält somit 5 ccm gesättiger Alkoholmethylenblaulösung + 5 ccm Acetaldehyds + 190 ccm destillierten Wassers.

Wir verfuhren auf folgende Weise: In drei Reagenzgläser von gleichem Durchmesser werden je 10 ccm kuhwarme Milch einer frischmilchenden Kuh eingeführt, und eine der Proben wird aufgekocht. Nach Abkühlen wird zu dieser Probe und zu einer der übrigen je 1 ccm AM (Acetaldehyd + Methylenblau) hinzugesetzt. In das dritte Reagenzglas wird 1 ccm des ursprünglichen *Schardinger*-Reagens (Formaldehyd + Methylenblau) hinzugezogen. Alle drei Proben werden im Wasserbad bei 65° stehengelassen. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle wiedergegeben, wo + und — die Entfärbung oder die Nichtentfärbung der Mischung während der ersten 30 Minuten bezeichnen. Unseren Beobachtungen nach entfärbt die Milch altmilchender Kühe das Reagens innerhalb der ersten 10 Minuten. Die von *Schardinger* eingehaltene Dauer von 30 Minuten genügt durchaus zur Beurteilung des Ausfalls der Reaktion.

Tabelle 11.

	Datum	Mit *Schardinger*-Reagens	Mit Acetaldehyd-Methylenblau
Kuh Nr. 2 kalbt am 2. V. 1925	Vom 2. V. bis 24. V. 27. V. 29. V.	— + +	+ + +
Kuh Nr. 13 kalbt am 16. VII. 1925	Vom 16. VII. bis 28. VII	—	+
Kuh Nr. 15 kalbt am 12. VI. 1925	Vom 13. VI. bis 18. VII. 20. VII. 22. VII.	— + +	+ + +
Kuh Nr. 37 kalbt am 2. VI. 1925	Vom 3. VI. bis 17. VI. 19. VI. 21. VI.	— + —	+ + +
Kuh Nr. 38 kalbt am 17. VI. 1925	Vom 19. VI. bis 13. VII.	—	+

Es geht aus dieser Tabelle hervor, daß das AM-Reagens in sämtlichen von uns beobachteten Fällen durch die Milch „frischmilchender" Kühe entfärbt wurde, während FM-Reagens durch erst 3 bis 4 Wochen nach der Entbindung gewonnene Milch sich entfärben läßt. Deshalb

halten wir es für ratsam, Acetaldehyd anstatt Formaldehyd zur Ausführung der Reaktion in der Praxis anzuwenden. Dieses Reagens hat sich für die Milch altmilchender sowie auch frischmilchender Kühe als brauchbar erwiesen.

Bei der Anwendung der *Bach*schen Nitratmethode haben wir, wie es aus der folgenden Tabelle III zu ersehen ist, keine einzige Probe Milch sogenannter frischmilchender Kühe angetroffen, in welcher die Perhydridase fehlt. Mit Hilfe dieser quantitativen Methode konnten wir auch noch feststellen, daß während der ersten 3 bis 4 Wochen nach der Entbindung der Perhydridasegehalt der Kuhmilch herabgesetzt ist und im allgemeinen mit der Entfernung von dem Moment der Entbindung anwächst.

Die Perhydridase der Milch altmilchender Kühe.

Mit Hilfe der Nitratmethode wurde eine systematische Untersuchung des Perhydridasegehalts der Milch von Kühen, welche im zweiten und dritten Monat der Lactation sich befanden, ausgeführt. Die Bedingungen, unter welchen die Kühe während der ganzen Untersuchungsperiode sich befanden, blieben in bezug auf die Fütterung und den Stallunterhalt konstant. Die Melkung erfolgte dreimal täglich zu bestimmten Zeiten. Für die Versuche wurde stets der Milchertrag der Mittagsmelkung (12 Uhr mittags) genommen. Es wurde stets die kuhwarme Milch untersucht. Alle Versuche wurden mit denselben Reagenzlösungen und in Reagenzgläsern gleichen Durchmessers ausgeführt.

Dem ganzen Milchertrag wurden Proben von je 1 ccm für die Bestimmung der Perhydridase und die Kontrolle entnommen. Diese letzte Probe wurde aufgekocht und alsdann auf Zimmertemperatur abgekühlt. In jedes Reagenzglas wurden je 1 ccm 10proz. $NaNO_3$-Lösung und 0,5 ccm 2proz. Acetaldehyd gegeben. Beide Reagenzgläser wurden 30 Minuten bei 65 bis 67° im Wasserbad stehengelassen. Daraufhin wurden in die Gläser je 2,5 ccm gesättigter Bleiacetatlösung hinzugefügt (Eiweißfällung). Die Flüssigkeiten wurden in graduierte Reagenzgläser filtriert und mit gleichen Volumina des *Ilosvay-Lunge*schen Reagens versetzt, das erhaltene Nitrit quantitativ bestimmt. Die Mengen des letzteren dienten als Maß des Perhydridasegehalts der Milchproben.

Wie wir sehen, erweist es sich, daß bei streng konstanten Bedingungen der Fütterung und des Gehalts die Perhydridasekonzentration der Kuhmilch von dem zweiten Monat nach der Entbindung an sich einer bestimmten konstanten Größe nähert. Die Schwankungen nach dieser oder jener Seite betragen im Verlauf von 3 bis 4 Wochen nicht

Kuh Nr. 1 kalbte am 8. III. 1925.

Datum . .	9. III.	11. III.	15. III.	17. III.	21. III.	23. III.	25. III.	29. III.	1. IV.	3. IV.	7. IV.
mg N_2O_3 . .	0,0018	0,0022	0,0024	0,0024	0,0026	0,0024	0,0023	0,0024	0,0023	0,0026	0,0030

Kuh Nr. 2 kalbte am 2. VI. 1925.

Datum . .	3. VI.	5. VI.	6. VI.	7. VI.	8. VI.	10. VI.	12. VI.	13. VI.	14. VI.	15. VI.	16. VI.	17. VI.	19. VI.	21. VI.	25. VI.	27. VI.	30. VI.
mg N_2O_3 . .	0,0020	0,0019	0,0020	0,0018	0,0019	0,0019	0,0020	0,0017	0,0017	0,0019	0,0017	0,0019	0,0020	0,0021	0,0023	0,0027	0,0029

Kuh Nr. 4 kalbte am 5. III. 1925.

Datum . .	5. III.	7. III.	11. III.	15. III.	19. III.	23. III.	27. III.	28. III.	2. IV.	4. IV.
mg N_2O_3 . .	0,0017	0,0022	0,0024	0,0023	0,0021	0,0024	0,0023	0,0022	0,0026	0,0027

Kuh Nr. 5 kalbte am 3. III. 1925.

Datum . .	7. III.	9. III.	13. III.	15. III.	21. III.	25. III.	26. III.	27. III.	29. III.	2. IV.	6. IV.
mg N_2O_3 . .	0,0015	0,0018	0,0017	0,0020	0,0022	0,0019	0,0018	0,0018	0,0021	0,0019	0,0021

Kuh Nr. 7 kalbte am 7. III. 1925.

Datum . .	7. III.	9. III.	13. III.	15. III.	21. III.	25. III.	27. III.	30. III.	4. IV.	6. IV.
mg N_2O_3 . .	0,0016	0,0018	0,0015	0,0018	0,0018	0,0017	0,0017	0,0018	0,0020	0,0023

Kuh Nr. 8 kalbte am 13. III. 1925.

Datum . .	13. III.	17. III.	21. III.	23. III.	25. III.	27. III.	29. III.	4. IV.	8. IV.	10. IV.	12. IV.
mg N_2O_3 . .	0,0019	0,0017	0,0021	0,0018	0,0019	0,0020	0,0020	0,0023	0,0022	0,0024	0,0025

Kuh Nr. 9 kalbte am 7. II. 1925.

Datum . .	22. II.	24. II.	26. II.	28. II.	2. III.	4. III.	6. III.
mg N_2O_3 . .	0,0020	0,0022	0,0020	0,0021	0,0024	0,0026	0,0026

Kuh Nr. 10 kalbte am 2. III. 1925.

Datum . .	3. III.	7. III.	9. III.	11. III.	13. III.	17. III.	19. III.	23. III.	25. III.	27. III.	29. III.	3. IV.
mg N_2O_3 . .	0,0016	0,0021	0,0018	0,0017	0,0019	0,0020	0,0018	0,0016	0,0018	0,0018	0,0020	0,0021

Kuh Nr. 12 kalbte am 12. II. 1925.

Datum . .	22. II.	24. II.	26. II.	28. II.	1. III.	3. III.	5. III.	7. III.	11. III.
mg N_2O_3 . .	0,0015	0,0016	0,0016	0,0018	0,0021	0,0017	0,0020	0,0021	0,0023

Kuh Nr. 15 kalbte am 12. VI. 1925.

Datum . .	13. VI.	14. VI.	15. VI.	16. VI.	17. VI.	19. VI.	21. VI.	23. VI.	25. VI.	27. VI.	29. VI.	1. VII.	4. VII.
mg N_2O_3 . .	0,0012	0,0015	0,0015	0,0020	0,0018	0,0018	0,0020	0,0018	0,0019	0,0020	0,0020	0,0022	0,0019

Kuh Nr. 37 kalbte am 2. VI. 1925.

Datum . .	3. VI.	5. VI.	7. VI.	9. VI.	11. VI.	13. VI.	15. VI.	19. VI.	1. VII.
mg N_2O_3 . .	0,0019	0,0021	0,0020	0,0020	0,0018	0,0017	0,0021	0,0023	0,0024

Kuh Nr. 38 kalbte am 17. VI. 1925.

Datum . .	19. VI.	1. VII.
mg N_2O_3 . .	0,0017	0,0021

Tabelle IV. 1 ccm Milch von „altmilchenden" Kühen liefert:

																Durchschnitt
Kuh Nr. 1 kalbte am 8. III. 1925.																
Datum . .	8. IV.	10. IV.	12. IV.	14. IV.	16. IV.	18. IV.	20. IV.	22. IV.	24. IV.	26. IV.	28. IV.	30. IV.	3. V.			
mg N_2O_3 .	0,0033	0,0034	0,0032	0,0033	0,0033	0,0031	0,0031	0,0034	0,0032	0,0033	0,0033	0,0034	0,0032			0,00327
Kuh Nr. 4 kalbte am 5. III. 1925.																
Datum . .	8. IV.	10. IV.	12. IV.	14. IV.	16. IV.	18. IV.	20. IV.	22. IV.	24. IV.	26. IV.	28. IV.	30. IV.	3. V.			
mg N_2O_3 .	0,0028	0,0029	0,0028	0,0030	0,0028	0,0029	0,0029	0,0030	0,0028	0,0030	0,0027	0,0030	0,0029			0,00288
Kuh Nr. 5 kalbte am 3. III. 1925.																
Datum . .	8. IV.	10. IV.	12. IV.	14. IV.	16. IV.	18. IV.	20. IV.	22. IV.	24. IV.	26. IV.	28. IV.	30. IV.	1. V.	2. V.	3. V.	
mg N_2O_3 .	0,0022	0,0020	0,0020	0,0022	0,0022	0,0021	0,0021	0,0021	0,0023	0,0021	0,0021	0,0022	0,0021	0,0023	0,0022	0,00215
Kuh Nr. 6 kalbte am 10. XII. 1924.																
Datum . .	22. II.	24. II.	26. II.	28. II.	1. III.	3. III.	5. III.	7. III.	9. III.	11. III.	13. III.	15. III.	17. III.			
mg N_2O_3 .	0,0030	0,0030	0,0031	0,0033	0,0033	0,0032	0,0030	0,0032	0,0033	0,0033	0,0031	0,0033	0,0032			0,00218
Kuh Nr. 7 kalbte am 7. III. 1925.																
Datum . .	8. IV.	10. IV.	12. IV.	14. IV.	16. IV.	18. IV.	20. IV.	22. IV.	24. IV.	26. IV.	28. IV.	1. V.	3. V.			
mg N_2O_3 .	0,0026	0,0025	0,0025	0,0027	0,0027	0,0028	0,0027	0,0026	0,0028	0,0027	0,0027	0,0026	0,0027			0,00266
Kuh Nr. 8 kalbte am 13. III. 1925.																
Datum . .	14. IV.	16. IV.	18. IV.	20. IV.	22. IV.	24. IV.	26. IV.	28. IV.	30. IV.	2. V.						
mg N_2O_3 .	0,0025	0,0027	0,0028	0,0027	0,0028	0,0026	0,0028	0,0028	0,0027	0,0026						0,0027
Kuh Nr. 9 kalbte am 7. II. 1925.																
Datum . .	9. III.	11. III.	13. III.	15. III.	17. III.	19. III.	23. III.	25. III.	27. III.	29. III.	2. IV.	4. IV.	6. IV.			
mg N_2O_3 .	0,0029	0,0020	0,0030	0,0028	0,0030	0,0020	0,0030	0,0028	0,0030	0,0029	0,0028	0,0030	0,0031			0,00293
Kuh Nr. 10 kalbte am 2. III. 1925.																
Datum . .	4. IV.	6. IV.	8. IV.	10. IV.	12. IV.	14. IV.	16. IV.	18. IV.	20. IV.	22. IV.	24. IV.	28. IV.	30. IV.	2. V.		
mg N_2O_3 .	0,0023	0,0022	0,0021	0,0021	0,0021	0,0023	0,0022	0,0021	0,0022	0,0023	0,0023	0,0024	0,0022	0,0021		0,0022
Kuh Nr. 14 kalbte am 2. XII. 1924.																
Datum . .	24. II.	26. II.	28. II.	1. III.	3. III.	5. III.	7. III.	9. III.	11. III.	13. III.	15. III.	17. III.	19. III.	21. III.		
mg N_2O_3 .	0,0030	0,0030	0,0032	0,0033	0,0034	0,0033	0,0031	0,0032	0,0032	0,0034	0,0032	0,0031	0,0033	0,0034		0,00321

mehr als 5 bis 6 Proz. Diese konstante Durchschnittsgröße ist für jedes einzelne Tier, unabhängig von seiner Rasse, charakteristisch.

Uns standen zur Verfügung einige Exemplare von Kühen kleinwüchsiger kaukasischer Rasse; obgleich diese Exemplare eine Milch mit geringerem Perhydridasegehalt gegeben haben, steht es immerhin fest, daß die Schwankungsamplitude des Fermentgehalts im Bereich einer und derselben Rasse die Differenz im Fermentgehalt bei Vertretern verschiedener Rassen übersteigt. Für unsere Versuche benutzten wir die Milch von Kühen sehr verschiedener Rassen, unter welchen außer den russischen Rassen noch die holländische, die Simmenthaler, die Freiburger und andere vertreten waren. Auf Grund unserer Versuche ist es uns jedoch nicht gelungen, irgend einen Zusammenhang zwischen der Rasse des Tieres und dem Perhydridasegehalt in seiner Milch zu konstatieren.

Das Fett und die Perhydridase der Kuhmilch.

In Arbeiten über das „*Schardinger*-Enzym" wurde mehrmals auf den Zusammenhang zwischen dem Gehalt der Milch an diesem Enzym und dem Fettgehalt hingewiesen.

Bekanntlich geht beim Zentrifugieren der Milch die Hauptmenge des Ferments in den Rahm über [*Seligmann* (12), *Sbarsky* und *Michlin* (13)]. *Jensen* (14) hat gefunden, daß in den beim Ausmelken zuletzt erhaltenen, besonders fettreichen Portionen der Milch auch das *Schardinger*-Enzym in größeren Mengen als in den ersten Portionen vorhanden ist. Er zieht daraus den Schluß, daß das Ferment im Zusammenhang mit dem Fett steht. Dieser Schluß steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von *Sbarsky* und *Michlin*, welche gezeigt haben, daß in der Butter nur ganz geringe Mengen Perhydridase vorhanden sind. Bei der Butterproduktion wird das Ferment mechanisch von den Fettkörperchen abgetrennt und in der entfetteten Buttermilch angesammelt, wo sein Gehalt denjenigen der Vollmilch um einigemal übertrifft.

Es war von Interesse, diese Frage mittels der *Bach*schen Nitratmethode aufzuklären. Zu diesem Zwecke wählten wir 19 Kühe zweier mittelrussischen Rassen (Jaroslawler und Gorbatower), welche unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Aus dem mittäglichen Milchertrag jeder Kuh nahmen wir je 100 bis 150 ccm Milch. Die parallele Bestimmung der Perhydridase nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde in Reagenzgläsern gleichen Durchmessers, in welche je 1 ccm Milch genommen war, ausgeführt. In der übrigen Milch wurde einige Stunden nach dem Abkühlen das spezifische Gewicht jeder Probe mit Hilfe des Lactodensimeters bestimmt. Daraufhin wurde das Fett nach der acidobutyrometrischen Methode *Gerbers* bestimmt. In Tabelle V werden die Ergebnisse einer der zahlreichen Versuchsreihen angeführt.

Tabelle V.

Nr. der Kühe	Spezifisches Gewicht	Fettgehalt Proz.	N_2O_3 mg	Nr. der Kühe	Spezifisches Gewicht	Fettgehalt Proz.	N_2O_3 mg
18	1,0312	3,5	0,0019	28	1,0318	4,0	0,0047
19	1,0324	3,6	0,0042	29	1,0314	4,0	0,0024
20	1,0320	3,6	0,0024	30	1,0320	4,1	0,0035
21	1,0322	3,7	0,0023	31	1,0326	4,2	0,0022
22	1,0332	3,8	0,0021	32	1,0322	4,2	0,0043
23	1,0332	3,8	0,0030	33	1,0318	4,3	0,0033
24	1,0330	3,8	0,0024	34	1,0316	4,5	0,0027
25	1,0334	3,9	0,0024	35	1,0322	4,6	0,0024
26	1,0320	3,9	0,0020	36	1,0326	4,6	0,0041
27	1,0326	4,0	0,0027				

Einen Zusammenhang zwischen dem spezifischen Gewicht der Milch und der Perhydridasekonzentration konnten wir in keinem einzigen Falle feststellen, wie auch keinen Parallelismus zwischen dem Fettgehalt der Kuhmilch und der Perhydridase. Die Ergebnisse unserer Versuche stimmen vollkommen mit der schon früher durch *Sbarsky* und *Michlin* ausgesprochenen Meinung überein, wonach der Zusammenhang zwischen der Milchperhydridase und den Fettkörperchen rein adsorptiver Art ist und daher das Fett weder an der Fermentbildung, noch an der Verstärkung seiner Wirkung irgendeinen Anteil hat. Die Fettkörperchen adsorbieren die Perhydridase, welche in der Milch im präformierten Zustande vorhanden ist.

Zusammenfassung.

1. Das Colostrum der Kühe, welche früher schon lactiert haben, enthält beträchtliche Perhydridasemengen, während der ganzen Periode des Trockenstehens.

2. Im Colostrum der erstmalig schwangeren Kühe erscheint die Perhydridase erst 1 bis 2 Wochen vor der Entbindung.

3. Die Milchperhydridase ist das Sekretionsprodukt einer reifen, zur normalen Lactation fähigen Brustdrüse.

4. Perhydridase ist in der Milch der frischmilchenden Kühe vom ersten Tage nach der Entbindung ab stets enthalten und kann mit Hilfe der Nitratmethode nachgewiesen werden.

5. Die einmal eingetretene Fähigkeit der Brustdrüse, Perhydridase zu sezernieren, bleibt ununterbrochen während des ganzen normalen Lebens des Tieres.

6. Unter mehreren Hundert Milchproben von verschiedenen Rassen, Altersstufen und Lactationsperioden, die von uns untersucht wurden, haben wir keine einzige Probe angetroffen, in der die Perhydridase fehlte.

7. Bei streng konstanten Gehaltsbedingungen der Kuh bleibt in ihrer Milch die Perhydridasekonzentration vom zweiten Monat der Lactation an fast konstant und weist im Verlauf eines Monats Schwankungen in Grenzen von 5 bis 6 Proz. auf.

8. Mit Hilfe der Nitratmethode der quantitativen Bestimmung der Perhydridase wurde gefunden, daß der Fettgehalt der Kuhmilch keinesfalls für den Perhydridasegehalt dieser Milch als Exponent dienen kann.

Das Versuchsmaterial zu dieser Arbeit verdanke ich Herrn Dr. *G. A. Sergejeff*.

Literatur.

1) *Schardinger*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel **5**, 1902. — 2) *Bach*, diese Zeitschr. **31**, 443, 1911; **33**, 282, 1911; **38**, 154, 1912; **52**, 412, 1913; **58**, 205, 1914. — 3) *Gruber*, Inaug.-Diss. Stuttgart, 1912; zitiert nach Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., Lief. 28, S. 780, 1925. — 4) *Sassenhagen*, Arch. f. Kinderheilk. 1910; zitiert nach Oppenheimer, l. c. — 5) *Schern*, diese Zeitschr. **18**, 261, 1909. — 6) *Trommsdorf*, Zentralbl. f. Bakteriol. **49**, 1909. — 7) *Schein*, Wien. med. Wochenschr. 1907, S. 34. — 8) *König*, Chem. d. menschl. Nahrungs- u. Genußmittel **1**, 254, 1903. — 9) *Winterstein* und *Strickler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**, 58, 1906. — 10) *König*, Chem. d. menschl. Nahrungs- u. Genußmittel, Nachtrag zu **1**, 324, 1919. — 11) Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. IV, Teil 8, S. 591, 1923. — 12) *Seligmann*, Zeitschr. f. Hygiene **52**, 1906. — 13) *Sbarsky* und *Michlin*, diese Zeitschr. **155**, 455, 1925. — 14) *Jensen*, Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk. **11**, 18, 1907; zitiert nach Grimmers Chem. u. Physiol. der Milch, S. 214. Berlin 1906.

Über die Einwirkung einiger Narkotica auf die chemische Zusammensetzung der Großhirnrinde.

Von

Alexander Tscherkes und **Henriette Gorodissky.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des medizinischen Instituts zu Charkow.)

(Eingegangen am 1. November 1925.)

Die Lipoide gehören zu den spezifischsten chemischen Bestandteilen des Zentralnervensystems. Die Frage nach ihrer Bedeutung für die Hirntätigkeit wurde vielfach erörtert, was jedoch zu keiner einheitlichen Auffassung führte. Es behaupteten sich vielmehr zwei einander völlig entgegengesetzte Standpunkte. Auf der einen Seite werden die Lipoide von älteren Autoren in den Vordergrund gerückt, und es wird ihnen die aktivste funktionelle Bedeutung zugeschrieben. Auf der anderen Seite wird die nicht minder begründete Meinung vertreten, ihre Rolle sei rein passiv und es handle sich nur um Substanzen von hohem Kalorienwert bzw. lediglich um Brennmaterial. Und es drängt sich unwillkürlich die Frage auf: handelt es sich wirklich nur um thermisches Material? Warum sind dann die Lipoide so verschiedenartig? Warum ist dann ihr Bau so kompliziert und ihre biologische Bedeutung so mannigfach? Wie ist dann ihr Einfluß auf eine ganze Reihe fermentativer Prozesse und ihre Rolle in der Immunität zu erklären? Was berechtigt dazu, ihre Rolle im Zentralnervensystem, also gerade dort, wo sie in besonders großer Menge vorhanden und wo sie mit einer bestimmten Gesetzmäßigkeit verteilt sind, als passiv zu betrachten? Weshalb soll man sie lediglich für Brennmaterial gerade im Zentralnervensystem halten, in dem der Verlauf der biochemischen Prozesse noch so wenig erforscht ist und in vielen Punkten noch so ungeklärt bleibt? Es genügt ja, die Arbeiten von *Linnert*, *Pighini*, *Ederer*, *Facchini*, *Schiff* und *Stransky* und vieler anderer zu betrachten und darauf hinzuweisen, daß keine der studierten psychischen Erkrankungen bei normalem Lipoidgehalt des Gehirns verläuft, daß der Lipoidgehalt der funktionell verschiedenen Teile der Hirnrinde verschieden ist, daß die funktionelle Entwicklung des Kinderhirns zum

erwachsenen und dann sein allmähliches Erlöschen unbedingt mit Veränderungen in seinem Lipoidgehalt verbunden sind, und die Antwort drängt sich von selbst auf: Die Lipoide sind für die Hirnfunktion unentbehrlich, sie sind eines der grundlegenden Strukturelemente der Nervenzelle. Ihre Rolle aber, die Bedeutung eines jeden uns bekannten lipoiden Stoffes und ihre gegenseitigen Beziehungen in der Tätigkeit der Nervenzelle bleiben immer noch unbekannt und erfordern eine baldige Aufklärung.

Die funktionelle Bedeutung einer jeden lipoiden Substanz wird verständlich, wenn es nur gelingt, eine konstante Beziehung zwischen einer ganz bestimmten Störung der Hirnfunktion und einer ebenfalls genau bestimmten Veränderung im Gehalt und in der Gruppierung verschiedener Lipoide nachzuweisen. Die verhältnismäßig seltenen Versuche der Forscher, sich im Verlaufe der mit der Hirntätigkeit verbundenen chemischen Prozesse zurechtzufinden, führten jedoch bisher nur zu wenigen bruchstückartigen und einander oft widersprechenden Erkenntnissen. Dies ist in den vielen, häufig ganz unüberwindlichen Schwierigkeiten begründet, denen man begegnet, sobald man das Gehirn in die Bedingungen eines bestimmten Experiments versetzen will. Es ist schwer, dem Gehirn auf experimentellem Wege den Zustand einer völligen „physiologischen“ Ruhe zu verschaffen, nicht minder schwierig ist es, experimentell den Zustand seiner „physiologischen“ Erregung hervorzurufen und ein Kriterium zur Beurteilung der Intensität, der Dauer und des Umfangs der erzeugten Erregung zu finden. In dieser Hinsicht könnte man wohl vieles von verschiedenen pharmakologischen Substanzen erwarten, welche die Hirnfunktion herabsetzen, den Schlaf, die Lähmung bestimmter Hirnzentren und sogar vollständige Narkose hervorrufen, und andererseits von solchen, die die Hirntätigkeit steigern, die Hirnzentren erregen, ihre Erregbarkeit erhöhen usw. Und in der Tat wird der Einfluß dieser Stoffe auf die chemische Zusammensetzung des Zentralnervensystems seit langer Zeit studiert. Jedoch gelang es nicht, mit Sicherheit festzustellen, von welchen Veränderungen in den chemischen Prozessen eine bestimmte Funktionsstörung begleitet wird. Und so schien es uns, daß nur ein Studium der Einwirkung dieser Gifte auf jedes einzelne Zentrum die Lösung herbeiführen kann. Denn ist der Raum verschiedener Zentren verschieden, so können auch die darin durch Gifte verursachten Veränderungen verschieden sein, und dann wird die funktionelle Bedeutung verschiedener Lipoidgruppen nur bei getrenntem Studium der einzelnen Zentren klar hervortreten. Dabei muß die Einwirkung des Giftes lange genug dauern, um ein ganz bestimmtes, für dieses Gift charakteristisches Bild zu erzeugen, immerhin aber auch nicht so lange, daß die damit verbundenen Veränderungen weitgehende Störungen im

ganzen Organismus hervorrufen, welche dann den Verlauf chemischer Prozesse im Gehirn sekundär beeinflussen könnten. Von diesen Erwägungen ausgehend, wählten wir zunächst Chloroform und Äther, da diese beiden Narkotica die ganze Hirnrinde lähmen, dabei jedoch chemisch verschieden sind, weshalb die damit erzielten Resultate besonders interessant zu Vergleichszwecken sind. Ferner studierten wir auch die Einwirkung von Chloralhydrat, einer Substanz, welche in ihrem Aufbau dem Chloroform ähnlich ist und in großen Dosen, wie auch Chloroform und Äther, den Zustand einer vollständigen Narkose hervorruft, jedoch ohne eine vorherige Erregung der Hirnrinde.

Die Arbeiten von *Soula*, *Waser* und anderen haben gezeigt, daß verschiedene pharmakologische Substanzen eine ganze Reihe von Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung des Gehirns hervorrufen. Jedoch untersuchten diese Autoren die Zusammensetzung des Gehirns in seiner Totalität und nur nach wiederholter Einführung des Giftes in den Tierorganismus. So vergiftete *Soula* Kaninchen mit Alkohol im Laufe von 4 bis 15 Tagen, mit Morphium 19 Tagen, mit Strychnin 22 Tagen, mit Kokain 13 Tagen. *Waser* führte dem Hunde große Dosen von Chloralhydrat im Laufe von etwa 7 Monaten ein, Paraldehyd und Veronalnatrium etwa 10 bis 11 Monate hindurch. Eine so lange dauernde Einwirkung des Giftes, dazu noch in großen Dosen, mußte natürlich eine ganze Reihe von Veränderungen im Tierorganismus erzeugen, welche notgedrungen auch den Chemismus des Gehirns beeinflußten. Indem wir also beschlossen, die einmalige und verhältnismäßig kurze (bis 2 Stunden) Einwirkung des Giftes zu studieren, standen wir vor allen Dingen vor der Frage: Kann das Gift überhaupt bei einer schon bekannten Intensität der Abbau- und Syntheseprozesse in der Nervensubstanz in einer so kurzen Frist merkliche Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung des Gehirns hervorrufen? Wir stellten deshalb, bevor wir an das Studium der Einwirkung dieser Narkotica auf den Chemismus der einzelnen, funktionell verschiedenen Zentren gingen, eine Reihe orientierender Versuche an Kaninchen an und beobachteten den Einfluß dieser Gifte auf den Lipoidgehalt der grauen Substanz der ganzen Großhirnrinde. Diese Versuche sollten zeigen: 1. ob die von uns gewählte Versuchsanordnung richtig ist, 2. ob der Lipoidgehalt der grauen Substanz durch Narkotica verändert wird und 3. welcher Art sind diese Veränderungen.

Die Ergebnisse unserer Vorversuche bilden den Inhalt dieser kurzen Mitteilung.

Methodik.

Es wurde die Einwirkung von Chloroform, Äther und Chloralhydrat auf die chemische Zusammensetzung der Großhirnrinde mit besonderer Berücksichtigung der Lipoide untersucht. Als Versuchstiere dienten

Kaninchen. Chloroform und Äther wurden mit Luft inhaliert, Chloralhydrat wurde in wässeriger Lösung per rectum eingeführt. Der Versuch wurde in der Weise ausgeführt, daß das Tier, nachdem es 40 bis 135 Minuten im Zustande der vollständigen Narkose war, noch in diesem Zustande durch Entbluten aus Art. carotis oder aus dem Herzen getötet wurde. Das Gehirn wurde sofort entnommen, und es wurde sofort die bestimmte abgewogene Menge der grauen Substanz des Gehirns angefertigt.

Hier wurden bestimmt: Gesamtstickstoff und Gesamtphosphor, Phosphor der ungesättigten Phosphatide, Cholesterin und Lipoide des alkoholischen Auszuges, d. h. die Gruppe der gesättigten Phosphatide, ferner Cerebroside und Sulfatide, desgleichen auch die Menge des festen Rückstandes und des Wassers.

Die Menge der *Lipoide* wurde nach der von einem von uns beschriebenen und dann etwas modifizierten Mikromethode bestimmt (*H. Gorodissky*). *Gesamtstickstoff* und *Gesamtphosphor* wurden folgendermaßen bestimmt: ein Stückchen Hirnsubstanz von 35 bis 40 mg, auf ein kleines Stück Papier genommen, wurde in einem mit einem Strich bei 10 ccm versehenen Reagenzglas mit Hilfe von 0,2 ccm konzentrierter H_2SO_4 und einiger Tropfen Perhydrol verbrannt. Vollständiges Verbrennen in etwa 15 Minuten. Nach Erkalten wurde destilliertes Wasser bis zum Strich aufgefüllt, es wurde gut gemischt und dann wurden mit einer Pipette 5 ccm entnommen und in einen 50 ccm fassenden Meßkolben gebracht, wo der Stickstoff nach *Folin* und *Gulik* mit dem *Winkler*schen Reagens bestimmt wurde. Als Standardlösung diente eine Ammoniumsulfatlösung, welche in 10 ccm Flüssigkeit 5 mg N enthält. Die Berechnung war die übliche. In den im Reagenzglas gebliebenen 5 ccm Flüssigkeit wurde Phosphor kolorimetrisch nach *Briggs* bestimmt, mit geringen, von uns zur Bestimmung der Lipoide des Gehirns vorgenommenen Modifikationen. Der *feste Rückstand* wurde nach einer der von *Bang* für das Blut beschriebenen analogen Methode bestimmt. Für die Brauchbarkeit dieser Methode zeugen die folgenden, von uns bei der Bestimmung des festen Rückstandes in einigen Proben einer und desselben Gehirns erhaltenen Zahlen (Tabelle I).

Tabelle I.

Nr.	Die abgewogene Menge der grauen Substanz des Gehirns mg	Fester Rückstand Proz.
1	a	20,52
	b	20,41
	c	20,46
2	a	19,82
	b	19,75
	c	20,00
	d	19,33
3	a	20,19
	b	20,22
	c	20,31

Vor allen Dingen untersuchten wir das Gehirn von acht normalen erwachsenen Kaninchen, welche wie die Versuchskaninchen, durch Entbluten getötet wurden. Tabelle II zeigt, daß der Prozentgehalt der frischen

Hirnrindensubstanz an Gesamtstickstoff, Gesamtphosphor und an verschiedenen Lipoiden bei normalen Kaninchen im großen und ganzen ziemlich konstant ist.

Tabelle II.

Normale Kaninchen.

Nr.	Geschlecht	Gewicht g	In Prozenten der frischen Substanz				
			Gesamt-N	Gesamt-P	Cholesterin	P-ungesättigter Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs
1	♂	1800	2,29	0,357	0,79	0,0805	2,74
2	♀	2100	2,05	0,341	0,85	0,0818	2,70
3	♂	2400	2,28	0,351	0,90	0,0831	2,58
4	♀	1750	2,08	0,323	0,75	0,0799	2,80
5	♀	2200	2,21	0,345	0,79	0,0808	2,67
6	♂	1800	2,27	0,356	0,83	0,0827	2,81
7	♂	2000	2,20	0,349	0,81	0,0817	2,61
8	♂	1950	2,30	0,349	0,80	0,0821	2,46
		Mittelwert:	**2,21**	**0,346**	**0,815**	**0,0816**	**2,67**

Durch Gegenüberstellung der Menge der verschiedenen Lipoidgruppen und durch Ausrechnen des Lipoidgehalts im Verhältnis zur Gesamtmenge aller stickstoffhaltigen Substanzen wurden die in Tabelle III wiedergegebenen Zahlen erhalten.

Tabelle III.

Normale Kaninchen.

Nr.	Verhältnis			P-ungesättigter Phosphatide des Gesamt-P Proz.	Pro 100 Einheiten des Gesamt-N		
	P-ungesättigter Phosphatide zu Lipoiden des Alkoholauszugs	P-ungesättigter Phosphatide zum Cholesterin	des Gesamt-P zum Gesamt-N		Cholesterin	P-ungesättigter Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs
1	1 : 33	1 : 9,8	1 : 6,5	22,55	34,5	3,52	120
2	1 : 33	1 : 10,4	1 : 6,0	23,93	40,5	3,99	132
3	1 : 31	1 : 10,8	1 : 6,5	23,68	39,5	3,64	113
4	1 : 35	1 : 9,4	1 : 6,1	24,74	36,1	3,84	135
5	1 : 33	1 : 9,8	1 : 6,4	23,38	35,7	3,66	121
6	1 : 34	1 : 10,0	1 : 6,4	23,23	36,6	3,64	124
7	1 : 32	1 : 9,9	1 : 6,3	23,41	36,8	3,71	119
8	1 : 30	1 : 9,8	1 : 6,6	23,52	34,8	3,57	107
Mittelwert:	**1 : 33**	**1 : 9,99**	**1 : 6,35**	**23,56**	**36,8**	**3,696**	**121**

Ein ganz anderes Bild der chemischen Zusammensetzung der Hirnrindensubstanz ergaben die einer mehr oder weniger lange dauernden Chloroformnarkose unterworfenen Kaninchen (Tabelle IV).

Hier zeigte sich unerwartet eine ziemlich bedeutende Abnahme der Menge von Gesamtstickstoff in der frischen Rindensubstanz — durchschnittlich ein Sinken von 2,21 Proz. in der Norm bis 1,92 Proz. im Versuch —, wobei kein einziges von den chloroformierten Kaninchen eine der Norm entsprechende Zahl ergab. Merklich verringerte sich auch die Menge von Gesamtphosphor, von 0,346 Proz. in der Norm auf 0,316 Proz. im Versuch.

Tabelle IV.

Chloroformnarkose.

Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Verabreicht. Chloroformmenge g	Dauer der Narkose Min.	Chloroformmenge pro 1 kg u. 1 Std. g	In Prozenten der frischen Substanz Gesamt-N	Gesamt-P	Cholesterin	P-ungesättigter Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs
9	♀	1500	7,5	41	7,3	1,96	0,313	0,81	0,0779	3,66
10	♀	1800	9,8	55	5,9	—	0,228	1,02	0,0751	3,42
11	♀	1750	5,3	60	3,0	1,93	0,326	0,90	0,0783	3,87
12	♂	1700	7,5	61	4,4	1,92	0,315	0,87	0,0781	3,28
13	♀	2200	9,0	70	3,5	1,87	0,308	0,84	0,0786	3,17
14	♀	1800	16,5	112	4,9	—	—	—	0,0544	2,72
				Mittelwert:		1,92	0,316*)	0,89	0,0776*)	3,48

*) Der Durchschnittsgehalt an Gesamtphosphor wurde ohne Berücksichtigung des Versuchs 10 ausgerechnet, derjenige von Phosphor der ungesättigten Phosphatide ohne Versuch 14.

Die Menge von Phosphor der ungesättigten Phosphatide sank von 0,0816 Proz. in der Norm bis 0,0776 Proz. im Versuch. Die maximalen Versuchszahlen reichen hier jedoch bis an die minimalen Zahlen bei normalen Tieren heran. Sehr stark sank die Menge von Phosphor der ungesättigten Phosphatide in Versuch 14, und zwar bis 0,0544 Proz. Möglicherweise muß dies mit der langen Dauer (112 Minuten) der Narkose in Verbindung gebracht werden. Dagegen kann die starke Abnahme der Gesamtphosphormenge in Versuch 10 (0,228 Proz.) weder durch die Dauer der Narkose, noch durch die dem Tiere verabreichte Chloroformmenge erklärt werden.

Die Einwirkung der Chloroformnarkose auf den Gehalt an Cholesterin und an Lipoiden des alkoholischen Auszuges offenbart sich in entgegengesetzter Richtung. Der Cholesteringehalt steigt im Durchschnitt von 0,815 Proz. der frischen Substanz in der Norm auf 0,89 Proz. und der Gehalt an gesättigten Phosphatiden, Cerebrosiden und Sulfatiden von 2,67 Proz. der frischen Substanz in der Norm auf 3,48 Proz. im Versuch. Es gelingt nicht, den Grad der Veränderung in der chemischen Zusammensetzung der Hirnrinde mit der innerhalb 1 Stunde pro Kilogramm Tiergewicht verabreichten Chloroformmenge in Verbindung zu bringen, vielleicht infolge der großen Flüchtigkeit des Chloroforms und der deshalb nicht immer genauen Dosierung. Beim Vergleichen der Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Hirnrinde mit der Dauer der Narkose kann jedoch eine gewisse Regelmäßigkeit wahrgenommen werden, so ist z. B. die Abnahme der Gesamtstickstoffmenge um so bedeutender, je länger die Narkose dauert.

Neben den quantitativen Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Hirnrinde wird bei Chloroformnarkose auch eine Umgruppierung ihrer Bestandteile beobachtet (Tabelle V).

Die Verringerung der Menge der Lipoide des Petroleum-Ätherauszugs bei einigem Ansteigen des Cholesteringehalts und einer bedeutenden Zunahme von Lipoiden des alkoholischen Auszugs verschiebt das Verhältnis des Phosphors der ungesättigten Phosphatide zu der Cholesterinmenge von 1 : 9,99 auf 1 : 11,5 und zu der Menge der Cerebroside und der gesättigten Phosphatide von 1 : 33 in der Norm auf 1 : 47 im Versuch. Dadurch wird betont, daß während der Chloroformnarkose Cholesterin, Cerebroside und

Tabelle V.

Chloroformnarkose.

Nr.	Dauer der Narkose Min.	Chloroform-menge pro 1 kg und 1 Std. g	Verhältnis P-ungesättigter Phosphatide zu Lipoiden des Alkoholauszugs	P-ungesättigter Phosphatide zum Cholesterin	des Gesamt-P zum Gesamt-N	P-ungesättigter Phosphatide des Gesamt-P Proz.	Pro 100 Einheiten des Gesamt-N Cholesterin	P-ungesättigter Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs
9	41	7,3	1 : 41	1 : 10,4	1 : 6,3	24,89	41,3	3,97	181
10	55	5,9	1 : 46	1 : 13,6	—	32,94	—	—	—
11	60	3,0	1 : 49	1 : 11,5	1 : 5,9	24,02	46,7	4,06	201
12	61	4,4	1 : 42	1 : 11,1	1 : 6,1	24,79	45,3	4,07	171
13	70	3,5	1 : 40	1 : 10,7	1 : 6,0	25,52	44,9	4,20	170
14	112	4,9	1 : 50	—	—	—	—	—	—
Mittelwert:			**1 : 47**	**1 : 11,5**	**1 : 6,1**	**26,43**	**44,6**	**4,07**	**181**

gesättigte Phosphatide, also Substanzen, die die meisten fermentativen Reaktionen hemmen können, in der Hirnrinde noch mehr als in der Norm den ungesättigten Lipoiden gegenüber vorherrschen.

Es stellt sich heraus, daß die Menge aller Lipoidgruppen im Vergleich zur Menge aller stickstoffhaltigen Substanzen, also pro 100 Einheiten des Gesamtstickstoffs, erhöht ist. Hier zeigt sich diese Erhöhung deutlicher auch für die Lipoide des Alkoholauszugs, wo man statt 121 in der Norm 181 im Versuch findet, und für Cholesterin (36,8 in der Norm, 44,6 im Versuch). Es ist hier sogar die Menge des Phosphors der ungesättigten Phosphatide merklich erhöht, von 3,696 in der Norm auf 4,07 im Versuch. Es ist bemerkenswert, daß der Phosphor der ungesättigten Phosphatide während der Chloroformnarkose nicht mehr 23,56 Proz. des Gesamtphosphors ausmacht, sondern mehr, und zwar 26,43 Proz. In Anbetracht dessen, daß die Menge der Lipoide des alkoholischen Auszugs und somit offenbar auch die Menge des Phosphors dieser Gruppe (gesättigte Phosphatide) zugenommen hat, ist es anzunehmen, daß das Sinken der Gesamtphosphormenge von 0,346 Proz. in der Norm auf 0,316 Proz. im Versuch im wesentlichen auf Kosten des Eiweiß-Phosphors erfolgt ist, was auch durch Abnahme der Gesamtstickstoffmenge bestätigt wird.

Zwischen Chloroform und Äther besteht in bezug auf ihre narkotische Wirkung auf das Gehirn ein lediglich quantitativer Unterschied, wobei Chloroform dem Äther an Intensität der Wirkung überlegen ist. Jedoch kann dies hinsichtlich der Einwirkung dieser Stoffe auf die chemische Zusammensetzung des Gehirns keinesfalls behauptet werden. Beide Substanzen, die eine ganze Reihe analoger Eigenschaften besitzen und in unseren Versuchen die Tiere in den Zustand einer vollständigen Narkose versetzten, üben eine bis zu einem gewissen Grad verschiedene, für jedes von diesen Giften charakteristische Wirkung auf die chemische Zusammensetzung der Großhirnrinde aus.

Äther bewirkt, wie auch Chloroform, in der Hirnrinde eine Verringerung der Gesamtstickstoffmenge, im Durchschnitt 2,02 Proz. der frischen Substanz (Tabelle VI). Jedoch ist diese Abnahme nur in Versuch 16 deutlich zu sehen, in den übrigen Versuchen dagegen bewegen sich die für den Gesamtstickstoff gefundenen Zahlen entweder innerhalb der normalen

Tabelle VI.

Äthernarkose.

Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Äthermenge g	Dauer der Narkose Min.	Äthermenge pro 1 kg und 1 Std. g	In Prozenten der frischen Substanz: Gesamt-N	Gesamt-P	Cholesterin	P-ungesättigter Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs
15	♂	2600	25,2	40	14,5	2,15	0,301	0,78	0,0808	3,61
16	♂	1800	10,8	55	6,5	1,87	0,298	0,79	0,0736	3,46
17	♂	2400	33,1	65	12,7	2,07	0,3185	0,86	0,0797	3,98
18	♂	2400	43,2	100	10,8	2,00	0,3093	0,79	0,0769	4,00
19	♂	2200	32,4	110	8,0	—	0,2739	—	0,0728	3,45
					Mittelwert:	2,02	0,3003	0,80	0,0768	3,70

Grenzen, wie im Versuch 15, oder sie erreichen die untere Grenze der Norm, wie in den Versuchen 17 und 18. Die Abnahme des Gesamtphosphors ist hier sogar etwas deutlicher als bei Chloroformnarkose (0,3003 Proz. der frischen Substanz), dasselbe läßt sich auch über die Menge des Phosphors der ungesättigten Phosphatide sagen (0,0768 Proz.). Jedoch gelang es hier trotz der langen Dauer der Narkose (100 und 110 Minuten) immerhin nicht, ein so bedeutendes Sinken der Menge des Phosphatiden-Phosphors zu erzielen, wie bei Chloroform im Versuch 14. Die Menge der Lipoide des alkoholischen Auszugs wird bei der Äthernarkose noch mehr gegenüber der erhöht, als bei Einwirkung von Chloroform — 3,70 Proz. der frischen Substanz. Cholesterin bleibt dagegen durchaus innerhalb der normalen Grenzen — 0,80 Proz. der frischen Substanz.

Tabelle VII.

Äthernarkose.

Nr.	Dauer der Narkose Min.	Äthermenge pro 1 kg und 1 Std. g	Verhältnis: P-ungesättigter Phosphatide zu Lipoiden des Alkoholauszugs	P-ungesättigter Phosphatide zum Cholesterin	des Gesamt-P zum Gesamt-N	P-ungesättigter Phosphatide des Gesamt-P Proz.	Pro 100 Einheiten des Gesamt-N: Cholesterin	P-ungesättigte Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs
15	40	14,5	1 : 45	1 : 9,7	1 : 7,1	26,84	36,3	3,76	168
16	55	6,5	1 : 47	1 : 10,7	1 : 6,3	24,66	42,2	3,88	185
17	65	12,7	1 : 50	1 : 10,8	1 : 6,5	25,03	41,5	3,85	192
18	100	10,8	1 : 52	1 : 10,3	1 : 6,5	24,86	39,5	3,84	200
19	110	8,0	1 : 47	—	—	26,57	—	—	—
Mittelwert:			1 : 48	1 : 10,4	1 : 6,6	25,95	39,9	3,88	186

Cholesterin (39,9) und Phosphor der ungesättigten Phosphatide bleiben, auf 100 Teile des Gesamtstickstoffs bezogen, nahe der Norm (Tabelle VII). Immerhin macht der Phosphor der ungesättigten Phosphatide einen etwas größeren Teil des Gesamtphosphors aus als in der Norm — 25,59 Proz. im Versuch, 23,56 Proz. in der Norm. Cerebroside, Sulfatide und gesättigte

Phosphatide liefern auch im Vergleich zur Menge aller stickstoffhaltigen Substanzen hohe Zahlen — 168 bis 200, im Durchschnitt 186.

Das Verhältnis verschiedener Lipoidgruppen untereinander gestaltet sich folgendermaßen (Tabelle VII): das Verhältnis zwischen dem Phosphor der ungesättigten Phosphatide und den Lipoiden des alkoholischen Auszugs bleibt dasselbe, wie bei Chloroform 1 : 48; sein Verhältnis zum Cholesterin nähert sich dagegen der Norm, 1 : 10,4. Ziemlich eigenartig ändert sich das Verhältnis zwischen dem Gesamtphosphor und dem Gesamtstickstoff, was besonders in Anbetracht des Reichtums der Hirnsubstanz an phosphorhaltigen Eiweißstoffen und phosphorhaltigen Lipoiden interessant ist. Dieses Verhältnis wird in der Norm durch den Quotienten 1 : 6,3 ausgedrückt, bei Chloroform ist es 1 : 6,1, bei Äther 1 : 6,6. Mit anderen Worten ist das Sinken des Gesamtphosphors im Vergleich zu demjenigen des Gesamtstickstoffs bei Chloroformnarkose schwächer, bei Äther dagegen stärker ausgeprägt.

Chloralhydrat, in seiner Wirkung bei Anwendung großer Dosen dem Chloroform ähnlich, ergab immerhin ein Bild, welches von dem bei Chloroformnarkose beobachteten verschieden ist (Tabelle VIII).

Vor allem fällt das starke Sinken des Phosphors der ungesättigten Phosphatide auf, im Durchschnitt bis 0,0531 Proz. der frischen Substanz. Einem so geringen Gehalt an ungesättigten Phosphatiden begegneten wir nur einmal bei lange dauernder Chloroformnarkose (112 Minuten) im Versuch 14. Es muß hier bemerkt werden, daß wir, nachdem wir das Kaninchen mit Chloralhydrat vergiftet hatten, es nur nach einem tiefen, 120 bis 135 Minuten dauernden Schlafe töteten. Trotz der starken Abnahme der Menge des Phosphors der ungesättigten Phosphatide, machte dieser immerhin einen der Norm durchaus entsprechenden Teil des Gesamtphosphors aus (23,82 Proz.), infolge eines nicht minder starken Sinkens des Gesamtphosphors, 0,238 Proz. der frischen Substanz statt der in der Norm üblichen 0,346 Proz. der frischen Substanz.

Unter Einwirkung von Chloralhydrat steigt die Menge der Lipoide des Alkoholauszugs nicht stark an, dagegen ändert sich stark das Verhältnis zwischen den mit Petroleum-Äther extrahierten und den mit Alkohol extrahierten Lipoiden, 1 : 57. Die durch Chlorhydrat hervorgerufene Cholesterinzunahme erreicht noch höhere Werte, als bei Anwendung von Chloroform, bis 1,39 Proz. der frischen Substanz (Mittelwert 1,08 Proz.). Der starken Abnahme des Phosphors der ungesättigten Phosphatide und der bedeutenden Cholesterinzunahme entsprechend, erreicht das Verhältnis zwischen diesen beiden Substanzen einen weder bei Chloroform noch bei Äther je beobachteten Wert von 1 : 23,5.

Bemerkenswert ist, daß diese weitgehenden, durch Chloralhydrat erzeugten Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Hirnrinde sogar 24 Stunden nach der Einführung des Giftes in den Tierorganismus nach nicht völlig ausgeglichen sind (Tabelle IX). Die Menge des Gesamtstickstoffs und der Lipoide des Alkoholauszugs kehrt zur Norm zurück; die Menge des Phosphors der ungesättigten Phosphatide erreicht nicht nur die Norm, sondern übersteigt sie sogar etwas. Der Cholesteringehalt bleibt erhöht.

Irgendwelche Veränderungen im Wassergehalt der Hirnrinde konnten bei keinem der drei Narkotica beobachtetet werden.

Der Einfluß der Narkotica und Schlafmittel auf die chemische Zusammensetzung des Gehirns wurde schon vielfach studiert, und die von uns

Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Chloralhydrat pro 1 kg g	Dauer der Narkose Min.	In Prozenten der frischen Substanz: Gesamt-N	Gesamt-P	Cholesterin	P-ungesättigter Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs	Verhältnis: P-ungesättigter Phosphatide zu Lipoiden des Alkoholauszugs	P-ungesättigter Phosphatide zu Cholesterin	des Gesamt-P zum Gesamt-N	P-ungesättigter Phosphatide des Gesamt-P Proz.	Pro 100 Einheiten des Gesamt-N: Cholesterin	P-ungesättigte Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs
20	♂	1650	0,7	120	—	—	1,24	0,0542	3,14	1 : 58	1 : 22,9	—	—	—	—	—
21	♂	1820	0,7	120	—	—	0,88	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	♂	1750	0,7	120	—	—	0,90	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	♀	2180	0,7	120	—	—	0,91	0,0509	2,79	1 : 55	—	—	—	—	—	—
24	♀	1800	0,7	125	2,06	0,238	1,15	0,0567	2,90	1 : 51	1 : 20,3	1 : 8,6	23,82	55,8	2,75	141
25	♀	1800	0,7	135	—	—	1,39	0,0507	3,25	1 : 64	1 : 27,4	—	—	—	—	—
Mittelwert:					—	—	1,08	0,0531	2,75	1 : 57	1 : 23,5	—	—	—	—	—

Tabelle IX.

Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Chloralhydrat pro 1 kg g	In Prozenten der frischen Substanz: Gesamt-N	Cholesterin	P-ungesättigter Phosphatide	Lipoide des Akoholauszugs	Verhältnis: P-ungesättigter Phosphatide zu Lipoiden des Alkoholauszugs	P-ungesättigter Phosphatide zu Cholesterin	Pro 100 Einheiten des Gesamt-N: Cholesterin	P-ungesättigter Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs
26	♀	1500	0,7	2,23	1,17	0,0855	2,75	1 : 32	1 : 13,7	5,25	3,83	119

Bemerkung: Erwachen nach etwa $2^1/_2$ Stunden, getötet 24 Stunden nach Beginn der Narkose.

Tabelle X. Mittelwerte.

	In Prozenten der frischen Substanz: Gesamt-N	Gesamt-P	Cholesterin	P-ungesättigter Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs	Verhältnis: P-ungesättigter Phosphatide zu Lipoiden des Alkoholauszugs	P-ungesättigter Phosphatide zu Cholesterin	des Gesamt-P zum Gesamt-N	P-ungesättigter Phosphatide des Gesamt-P Proz.	Pro 100 Einheiten des Gesamt-N: Cholesterin	P-ungesättigte Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszugs
Normale Tiere	2,21	0,3464	0,815	0,0816	2,67	1 : 33	1 : 9,99	1 : 6,3	23,56	36,8	3,696	121
Chloroform . .	1,92	0,316	0,89	0,0776	3,48	1 : 47	1 : 11,5	1 : 6,1	26,43	44,6	4,07	181
Äther	2,02	0,3003	0,80	0,0768	3,70	1 : 48	1 : 10,4	1 : 6,6	25,59	39,9	3,83	186
Chloralhydrat .	—	—	1,08	0,0531	3,00	1 : 57	1 : 23,5	—	—	—	—	—

erzielten Ergebnisse stimmen bei weitem nicht immer mit dem überein, was wir auf Grund des uns aus der Literatur bekannten Materials erwarten durften. So fand *Soula*, daß der Gesamtstickstoffgehalt im Kaninchenhirn durch wiederholte Einführung von Alkohol von 1,54 Proz. in der Norm bis 1,58 und 1,62 Proz. steigt, wiederholte Morphiumeinführung erhöht den Stickstoffgehalt sogar bis 1,85 Proz. Diese Befunde werden durch die Arbeit von *Winterstein* und *Hirschberg* bestätigt, welche zeigten, daß der Verbrauch der stickstoffhaltigen Substanzen im isolierten überlebenden Froschgehirn unter dem Einfluß von Alkohol bis zur Fehlergrenze der Methode herabsinkt. Ferner fand *Hecker* am isolierten Zentralnervensystem des Frosches, daß die Einwirkung von Urethan ein Ansteigen der Menge des Gesamtstickstoffs von 0,1612 auf 0,1848 Proz. und von 0,1438 auf 0,1683 Proz. hervorruft. Die genannten Autoren sind der Meinung, daß im Narkosezustande der Zerfall der stickstoffhaltigen und der phosphorhaltigen Substanzen abgeschwächt wird. Italienische Forscher — *Carati*, *Novi* — untersuchten die qualitativen und quantitativen Veränderungen im Lipoidgehalt des Gehirns bei Chloroformnarkose und fanden dabei eine Störung des Verhältnisses zwischen Lecithin und Cholesterin, im Sinne einer Zunahme der Gehirnphosphate (Lecithine) auf Kosten eines Fett- und Cholesterinrückganges. *La Mandola* bestimmte den Gesamtgehalt der Lipoide im ganzen Gehirn bei mit Veronal und Luminal-Na vergifteten Hunden und fand in dieser Hinsicht keinen merklichen Unterschied zwischen dem Gehirn der normalen und demjenigen der narkotisierten Tiere. *In keinem von unseren Versuchen wurde eine Erhöhung der Menge von Gesamtstickstoff und Gesamtphosphor beobachtet, ihre Menge sank vielmehr deutlich, dagegen der Cholesteringehalt in den meisten Versuchen anstieg.* Dieser scheinbare Widerspruch kann dadurch erklärt werden, daß *Soula*, *Winterstein* und *Hirschberg*, *Hecker*, *La Mandola* u. a. das Gehirn als ein Ganzes untersuchten, wir aber die chemische Zusammensetzung nur der Rindensubstanz studierten. *Palladin* und *Zuwerkalow* und *Palladin* und *Bjeljaewa* haben aber gezeigt, daß die Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der grauen und der weißen Substanz nicht nur verschieden, sondern sogar einander entgegengesetzt sein können. Schon allein aus diesem Grunde kann eine völlige Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit den Befunden der genannten Autoren nicht erwartet werden. Ferner ist es auch möglich, daß zu Beginn der Äther- und Chloroformeinwirkung, also während des Erregungszustandes des Nervensystems, der gesteigerte Zerfall der stickstoffhaltigen und phosphorhaltigen Substanzen eine Verringerung der Menge des Gesamtstickstoffs und des Gesamtphosphors hervorruft, während des darauffolgenden, von einer Herabsetzung der Lebenstätigkeit der Zellen begleiteten Narkosezustandes kann aber der normale chemische Aufbau der Hirnrinde nicht wiedererlangt werden.

Waser studierte die Einwirkung der lange dauernden Anwendung von Schlafmitteln auf den Lipoidgehalt des Hundehirns. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fand er, daß Chloralhydrat den Cholesteringehalt im Gehirn erhöht und den Lecithingehalt herabsetzt (in unseren Versuchen Sinken der Menge des Phosphors der ungesättigten Phosphatide).

Ein Zustand des Zentralnervensystems, bei welchem sein richtiges und vollkommenes Funktionieren aus irgend einem Grunde nicht möglich ist, ist immer von bestimmten Veränderungen in der chemischen

Struktur der Hirnsubstanz, insbesondere bezüglich der Lipoide, begleitet. Der Narkosezustand stellt in dieser Hinsicht keine Ausnahme dar. Eine 40 Minuten lange Einwirkung von Chloroform (Versuch 9) oder Äther (Versuch 15) genügt schon, um eine ganz bestimmte Veränderung im Gehalt und in der Gruppierung der lipoiden Substanzen in der Großhirnrinde zu erzeugen. Und der Organismus bewältigt nicht leicht die durch Narkotica hervorgerufenen Störungen im Gehirn, denn sogar 24 Stunden nach Einführung des Giftes ist der normale chemische Aufbau der Hirnrinde noch nicht völlig wieder hergestellt (Versuch 26). *Alle drei Gifte verändern den Lipoidgehalt der Hirnrinde* (Tabelle X), *indem sie die Menge der ungesättigten Phosphatide herabsetzen und den Gehalt der Lipoide des alkoholischen Auszugs erhöhen.* Am stärksten werden der Cholesteringehalt und die Menge der ungesättigten Lipoide durch Chloralhydrat verändert, die Menge der gesättigten Lipoide dagegen durch Äther. Die Menge des Gesamtstickstoffs wird durch Chloroform stärker als durch Äther herabgesetzt, dagegen wird der Gesamtphosphor stärker durch Äther beeinflußt. Das gegenseitige Verhältnis der verschiedenen Lipoidgruppen wird am intensivsten durch Chloralhydrat verändert. *Alle drei Substanzen, die in unseren Versuchen dasselbe klinische Bild einer tiefen Narkose erzeugten, riefen nicht nur verschiedene Störungen der chemischen Struktur der Hirnrinde hervor, sondern diese Störungen sind auch für jedes von diesen Giften charakteristisch, was scheinbar durch ihre verschiedenen chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften zu erklären ist* (Tabelle X). Alles das spricht dafür, daß die Anwendung verschiedener pharmakologischer Substanzen zur Untersuchung biochemischer, in verschiedenen Zentren verlaufender Prozesse nur sehr beschränkt sein kann und daß die Auslegung der gewonnenen Ergebnisse äußerst vorsichtig sein muß. Der Einfluß dieser Stoffe auf den Verlauf der chemischen Prozesse im Gehirn kann keinesfalls nur als Erhöhung oder Herabsetzung der Hirnfunktion betrachtet werden, und ihre Anwendung zum Studium der biochemischen Dynamik verschiedener Zentren kann keine Lösung der Frage nach der funktionellen Bedeutung der einzelnen Lipoide herbeiführen. Ihre Anwendung kann vom pharmakologisch-toxikologischen Standpunkt aus interessant sein, und die Befunde unserer Versuche, durch welche bestimmte Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Hirnrinde unter dem Einfluß der Narkotica aufzeigen (Sinken des Gehalts des Gesamtstickstoffs und der ungesättigten Phosphatide, Erhöhung der Menge der Lipoide des Alkoholauszuges, die größere oder geringere Reversibilität dieser Veränderungen), können einige Bedeutung für das Verständnis des Biochemismus der im Gehirn bei Narkose verlaufenden Prozesse haben.

Das weitere Studium der normalen chemischen Statik und Dynamik der einzelnen Zentren[1]) eröffnet zugleich neue Aussichten zur Klärung des Wesens der Wirkung der Gifte des Zentralnervensystems.

Literatur.

Carati, zitiert nach *La Mandola*. — *H. Gorodissky*, diese Zeitschr. **159**, 379, 1925. — *Dieselbe*, ebendaselbst **164**, 446, 1925. — *Hecker*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **129**, 26, 1923. — *Hirschberg* und *Winterstein*, ebendaselbst **101**, 212, 1918. — *La Mandola*, Arch. di pharm. sperim, 1924, H. 1/2, S. 38 (Ref. Berichte über die ges. Phys. u. Pharm. **29**, 1925). — *Palladin* und *Bjelajewa*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **141**, 33, 1924. — *Palladin* und *Zuwerkalow*, ebendaselbst **189**, 57, 1924. — *Soula*, C. r. Soc. Biol. **64**, 404, 1912. — *Waser*, diese Zeitschr. **94**, 191, 1915.

[1]) Eine Arbeit zur Erforschung der normalen chemischen Dynamik der einzelnen kortikalen Zentren ist bereits im Physiologisch-Chemischen Laboratorium des Charkower Medizinischen Instituts (Leiter: Prof. *A. Palladin*) im Gange.

Quantitative Bestimmung wasserlöslicher Exkrete von Wassertieren.

Von

Emil Lenk.

(Aus der biologischen Station Lunz, Niederösterreich.)

(Eingegangen am 6. November 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In *Abderhaldens* Biochem. Arbeitsmethoden **3**, 2, 1910 publizierte *Henze* eine Arbeit über Stoffwechseluntersuchungen an Wassertieren. Mit Recht erwähnt er, daß die Bestimmung der von Wassertieren im Stoffwechsel ausgeschiedenen Substanzen zu den schwierigsten Aufgaben gehört. Es sind einerseits diesen Tieren eine gleich zusammengesetzte Nahrung beizubringen, und andererseits die Stoffwechselprodukte aus Salzlösungen zu isolieren, was bei Landtieren unvergleichlich leichter vonstatten geht. Deshalb sagt *Bütter*[1]), es käme weniger darauf an, die Ausscheidungen eines bestimmten Stoffwechselstoffes zu verfolgen, sondern vielmehr vorerst allgemeine Angaben zur Orientierung zu sammeln. Eine Zusammenstellung über das einschlägige Gebiet lieferte *Otto Fürth*[2]).

Für exakte Stoffwechseluntersuchungen an Wassertieren ist die Sauerstoffzehrung des Wassers besonders wichtig. In abgeschlossenen Wässern beobachtet man allmählich eine Verminderung des Sauerstoffgehalts im Wasser, der durch die Gegenwart von Mikroorganismen, Nahrungsresten und ähnlichen Faktoren noch bedeutend herabgesetzt werden kann. Diese Sauerstoffzehrung ist bei genauen Stoffwechseluntersuchungen bei Wassertieren nicht zu unterschätzen. So sagt *Knauthe*[3]): „Diese Prozesse können an Intensität die Atmung der Fische erreichen und sogar übertreffen.“ Bei kurzdauernden Ver-

[1]) *Bütter*, Abhandl. d. Ges. zu Göttingen, Mathem.-physik. Kl., N. F., **6**, 1, 1908.

[2]) *Fürth*, Chemische Physiologie niederer Tiere. Jena 1903.

[3]) *Knauthe*, Zeitschr. f. Fischerei **6**, 139—184; Pflügers Arch. **73**, 490, 1898.

suchen und Verwendung von reinem Wasser spielen diese Faktoren kaum eine Rolle. Trotzdem wurde bei diesen Versuchen darauf Rücksicht genommen. Ferner ist die Einhaltung einer bestimmten Temperatur von Wichtigkeit. *Knauthe*[1]) teilt mit, daß die Freßlust der Fische bei Temperatursteigerung abnehme und die Stickstoffausscheidung ansteige.

Quantitative Untersuchungen über den Gang der Ausscheidungen wurden, soweit mir bekannt ist, bei Wassertieren noch nicht durchgeführt. Die minimale Menge der ausgeschiedenen Substanzen im Vergleich zur relativ unendlichen Wassermenge war bisher nicht faßbar. Es lag nahe, diese Bestimmung mit Hilfe einer Apparatur zur Messung des elektrischen Leitvermögens auszuführen, wodurch die Möglichkeit gegeben war, die Widerstandsänderungen von Zeit zu Zeit und damit die Menge der wasserlöslichen Ausscheidungsprodukte festzustellen. Dazu diente ein tragbarer Apparat von *Pleissner*[2]), den die Firma R. Bosse & Co., Berlin, baut.

Als Versuchsmaterial verwendete ich kleine Fische, Pfrillen, auch Elritzen (Phoxinus laevis) genannt, wie ich sie schon früher für andere Untersuchungen benutzte[3]). Sie wurden im Lunzer See mit Netzen gefangen und sofort in große, gelüftete, mit Seewasser gefüllte und mit Glasplatten zugedeckte Aquarien gegeben. Zu den einzelnen Versuchen benutzte ich stets je 20 ausgesuchte, gleich große Exemplare, die in je 2 Liter durchlüftetes Seewasser kamen. Vorher wurden sie mit destilliertem Wasser (nach der Fütterung) gewaschen, ein Vorgang, der sicher nicht schadete, weil ich in einer früheren Arbeit[3]) feststellen konnte, daß diese Fischart in destilliertem Wasser wochenlang, ohne Fütterung unbeschadet leben kann. Um jedoch einem Irrtum zu entgehen, ob vielleicht Bakterien, Staub oder dergleichen die Versuche beeinflussen, wurde auch die eventuelle zeitliche Änderung der Salzkonzentration an destilliertem Wasser und Seewasser untersucht.

Das spezifische Leitvermögen einer Flüssigkeit berechnet man aus der Formel

$$k = \frac{C}{W} = \frac{C}{R\left(\frac{a}{1000 - a}\right)},$$

in welcher k das spezifische Leitvermögen, R den Vergleichswiderstand (in unserem Falle 100 Ohm), C die Kapazität der Taucherelektrode (in unserem Falle 0,05) und a die Drahtlänge darstellt, welche dem zu

[1]) l. c.

[2]) *M. Pleissner*, Wasser und Abwasser 2, 1910 (aus dem hygienischen Laboratorium des Kaiserl. Gesundheitsamtes Berlin).

[3]) *E. Lenk*, diese Zeitschr. 78, 15—106, 1916.

messenden Widerstand entspricht. Der so berechnete Wert ist das spezifische Leitvermögen der Flüssigkeit für die Versuchstemperatur. Will man untereinander vergleichbare Werte feststellen, so muß man das spezifische Leitvermögen auf die Normaltemperatur 18° (nach dem Vorschlag von *Kohlrausch*) umrechnen. Nach Untersuchungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 30, 520, 1909 beträgt der Temperaturkoeffizient natürlicher Wässer rund 0,023. Mit Hilfe der Formel

$$K_{18} = K_t \left(\frac{1}{1 + 0{,}023\,(t' - 18^0)}\right)$$

lassen sich die bei verschiedenen Temperaturen gefundenen Leitvermögen auf die bei 18° umrechnen.

Beispiel: Das Kontaktrad steht beim Tonminimum zwischen 4 und 5 und die Bogenmarke auf 82,3. Die linke Drahtlänge, die dem zu messenden Widerstand entspricht, ist 482,3 und die rechte Drahtlänge 1000 — 482,3 = 517,7 beim Vergleichswiderstand von 100 Ohm. Der gemessene Widerstand

$$W = \frac{a}{1000 - a} R = \frac{482{,}3}{517{,}7} \cdot 100 = 93{,}1 \text{ Ohm.}$$

Das spezifische Leitvermögen beträgt demnach $\frac{0{,}05}{93{,}1} = 0{,}000537$ $= 5{,}37 \,.\, 10^{-4}$ reziproke Ohm pro Zentimeter Würfel. Ist die Messung bei 16° ausgeführt worden, so berechnet man den Wert für k_{18} aus der Formel

$$\frac{5{,}37 \,.\, 10^{-4}}{1 + 0{,}023\,(16-18)} = 5{,}63 \,.\, 10^{-4}.$$

Der Faktor $\frac{a}{1000 - a}$ wird einer Tabelle aus *Ostwald* und *Luther*[1]) entnommen; eine Tabelle zur Umrechnung des spezifischen Leitvermögens von der Beobachtungstemperatur zwischen 0 und 25° auf die Normaltemperatur von 18° liegt jenem Apparat bei. Um nun aus dem spezifischen Leitvermögen (k_{18}) den Gehalt verdünnter Salzlösungen zu schätzen, ohne die gelösten Stoffe zu kennen, so multipliziert man k_{18} mit 10000 und erfährt so die im Liter gelöste Anzahl von Milligrammäquivalenten[2]). Da das Äquivalentgewicht der in Betracht kommenden Stoffe zwischen 60 und 90 liegt, so nimmt man 75 als Mittelwert an. $750000 \,.\, k_{18} = 0{,}75 \,.\, k_{18} \,.\, 10^6$ gibt daher die in einem Liter enthaltenen Milligramme an.

---

[1]) *Ostwald* und *Luther*, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physikochemischer Messungen, S. 409. Leipzig 1902.

[2]) *Kohlrausch* und *Holborn*, Leitvermögen der Elektrolyte, S. 131. Leipzig 1898.

Tabelle I. Destilliertes Wasser ohne Fische.

Stunden	a	t	$k_{18} \cdot 10^{-6}$	In 1 Liter mg
—	993,9	18,4	2,98	2,23
5	994,0	18,4	2,98	2,23
48	994,0	19,1	2,94	2,20
96	994,0	19,1	2,94	2,20

Tabelle II. Seewasser ohne Fische.

Stunden	a	t	$k_{18} \cdot 10^{-4}$	In 1 Liter mg
—	757,5	17,4	1,62	121
11	755,3	17,0	1,65	124
41	746,0	18,2	1,69	127
96	745,3	19,1	1,67	125

Tabelle III. Seewasser aus einem anderen Teile des Sees (ohne Fische).

Stunden	a	t	$k_{18} \cdot 10^{-4}$	In 1 Liter mg
—	751,1	17,6	1,66	125
24	747,4	18,8	1,67	125
48	744,1	19,3	1,66	125
96	744,7	19,2	1,67	125
144	744,1	19,3	1,66	125

Tabelle IV. 20 Fische in 2 Liter Seewasser.

20 Fische (24,2 g), die eine Woche kein Futter bekamen, wurden in 2 Liter destilliertes Wasser gegeben, dazu kamen 5 g trockenes Fischfutter. Nach 1 Stunde wurden die Fische mit Hilfe eines Netzes einzeln herausgenommen, mit destilliertem Wasser gut abgespült und in 2 Liter durchlüftetes, filtriertes Seewasser gebracht. Die Temperatur des Wassers wurde bei jeder Messung bestimmt, war aber nicht konstant.

Stunden	a	t	$k_{18} \cdot 10^{-4}$	In 1 Liter mg	6	7
—	746,0	18,2	1,69	127	—	—
1	746,0	18,2	1,69	127	0	0
2	746,4	18,0	1,70	127	0	0
3	730,1	20,1	1,76	132	5	0,25
4	728,3	20,2	1,77	133	6	0,30
5	725,5	20,2	1,80	135	8	0,40
10	718,0	20,0	1,87	140	13	0,65
17	705,4	19,2	2,04	153	26	1,30
25	687,1	20,6	2,15	160	33	1,65
30	682,9	19,9	2,22	167	40	2,00
43	676,9	19,1	2,33	175	48	2,40
90	654,4	18,0	2,64	198	71	3,55
118	649,2	17,1	2,76	207	80	4,00
125	648,2	16,9	2,80	210	83	4,15

Spalte 6 bedeutet Ausscheidung aller Fische, Milligramm in 1 Liter.
Spalte 7 bedeutet Ausscheidung eines Fisches, Milligramm in 1 Liter.

Tabelle V.

20 Fische in 2 Liter Seewasser bei einer konstanten Temperatur von 10°. Vorbehandlung der Fische s. Tabelle IV. Gewicht der Fische 25,4 g. 5 g Futter. Zur Konstanthaltung der Temperatur wurde das Aquarium mit den Fischen in ein großes, mit Wasser gefülltes Aquarium gestellt und hier durch Zufluß kalten bzw. warmen Wassers die Temperatur des kleineren Aquariums konstant gehalten.

Stunden	a	$k_{18} . 10^{-4}$	In 1 Liter mg	5	6
5	778,0	1,74	130	3	0,15
10	768,2	1,85	139	12	0,60
24	748,4	2,06	155	28	1,40
48	727,0	2,30	173	46	2,30
72	713,0	2,47	185	58	2,90
96	704,0	2,58	193	66	3,30
120	702,2	2,60	195	68	3,40
144	701,2	2,62	196	69	3,45

Spalte 5 bedeutet Ausscheidung aller Fische, Milligramm in 1 Liter.
Spalte 6 bedeutet Ausscheidung eines Fisches, Milligramm in 1 Liter.

Tabelle VI.

20 Fische in 2 Liter Seewasser bei einer konstanten Temperatur von 18°. Vorbehandlung der Fische s. Tabelle IV. Gewicht der Fische 24,8 g. 5 g Futter. Konstanthaltung der Temperatur s. Tabelle V.

Stunden	a	$k_{18} . 10^{-4}$	In 1 Liter mg	5	6
—	746,0	1,70	127	—	—
1	746,0	1,70	127	0	0
2	745,0	1,71	128	1	0,05
3	744,4	1,72	129	2	0,10
4	742,4	1,73	130	3	0,15
5	742,0	1,73	130	3	0,15
10	728,2	1,87	140	13	0,65
24	703,0	2,11	158	31	1,55
48	680,4	2,34	175	48	2,40
72	664,6	2,52	189	62	3,10
96	656,2	2,62	196	69	3,45
120	653,0	2,66	199	72	3,60
144	651,8	2,67	200	73	3,65

Spalte 5 bedeutet Ausscheidung aller Fische, Milligramm in 1 Liter.
Spalte 6 bedeutet Ausscheidung eines Fisches, Milligramm in 1 Liter.

Tabelle VII.

20 Fische in 2 Liter Seewasser bei einer konstanten Temperatur von 25°. Vorbehandlung der Fische s. Tabelle IV. Gewicht der Fische 23,0 g. 5 g Futter. Konstanthaltung der Temperatur s. Tabelle V.

Stunden	a	$k_{18}, 10^{-4}$	In 1 Liter mg	5	6
5	711,0	1,75	131	4	0,20
10	690,2	1,93	145	18	0,90
24	657,0	2,24	168	41	2,05
48	634,0	2,49	187	60	3,00
72	617,8	2,66	199	72	3,60
96	606,0	2,80	210	83	4,15
120	602,2	2,85	214	87	4,35
144	597,0	2,91	218	91	4,55

Spalte 5 bedeutet Ausscheidung aller Fische, Milligramm in 1 Liter.
Spalte 6 bedeutet Ausscheidung eines Fisches, Milligramm in 1 Liter.

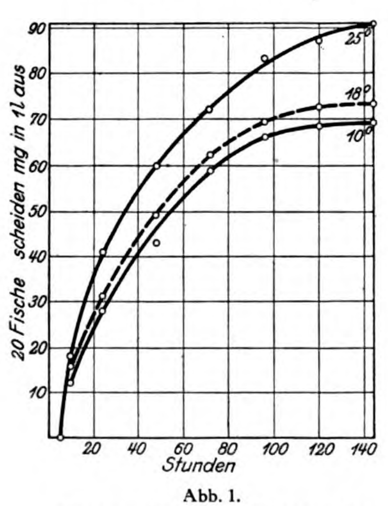


Abb. 1.
Zusammenhang der zeitlichen Ausscheidung der Fische bei 10, 18 und 25°.

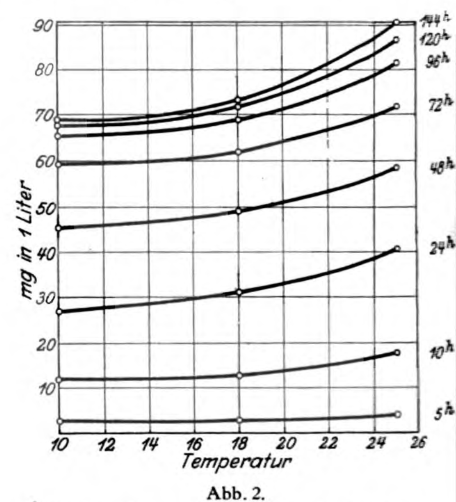


Abb. 2.
Zusammenhang zwischen Temperatur und ausgeschiedenen Mengen in bestimmten Zeiten.

Die Versuche zeigen deutlich eine Abhängigkeit der Exkretion von der Versuchstemperatur. *Van 't Hoff*[1]) bezeichnet als Temperaturkoeffizienten „das Verhältnis des Geschwindigkeitskoeffizienten einer Reaktion bei einer bestimmten Temperatur $t + 10^0$ zu dem Koeffizienten bei der um 10^0 niedrigeren Temperatur t, also den Quotienten $\frac{k_t + 10^0}{k_t}$ ".
Bei Reaktionen im homogenen System schwankt dieser Quotient (Q_{10}) zwischen 2 und 3,5. Es sind jedoch auch kleinere und größere

[1]) *Van 't Hoff*, Vorlesungen **1**, 224.

Quotienten bekannt[1]). Diese RGT-Regel, die besagt, daß der Geschwindigkeitskoeffizient zahlreicher chemischer Reaktionen bei einer Temperaturdifferenz von 10° auf das Doppelte bis Dreifache ansteigt, stimmt in vielen Fällen, auch bei Organismen, wie z. B. *Clausen*[2]) durch Bestimmung der stündlich abgegebenen Kohlensäuremengen bei Lupinen, Weizenkeimlingen und Syringablüten fand. Ebenso beweisend sind die Versuche *Oskar Hertwigs*[3]) über den Einfluß der Temperatur auf die Entwicklung des eben befruchteten Eies vom Frosch. Andere Arbeiten mit gleichem Ergebnis beschäftigen sich mit der Entwicklung von Eiern von Fischen, Seeigeln, Käfern usw., mit der Fortpflanzung, dem Ernährungsprozeß, der Atmung, dem Herzschlag usw.[4]).

Dieser Geschwindigkeitskoeffizient (Q_{10}) von 2 bis 3 soll für chemische Reaktionen, ein kleinerer, 1 bis 1,5 dagegen bei physikalischen Prozessen, z. B. bei Diffusionsvorgängen, maßgebend sein. In heterogenen Systemen fällt die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion fort und es herrscht nur die Diffusionsgeschwindigkeit vor. *Brunner*[5]) untersuchte z. B. die Auflösung von festem Magnesiumhydroxyd durch Benzoesäure, für welchen Vorgang *Nernst*[6]) die theoretische Grundlage gab. Danach nimmt die Auflösungsgeschwindigkeit bei Steigerung der Temperatur um 10° nur ungefähr um das 1- bis 1,5fache zu (zumeist um das 1,22- bis 1,28fache). Ebenso verläuft auch die Katalyse in heterogenen Systemen[7]).

Aber diese Trennung zwischen chemischen und physikalischen Prozessen erwies sich jedoch nicht immer als berechtigt, da es auch chemische Vorgänge mit kleinerem Q_{10} gibt [z. B. Esterverseifung[8])].

In der Tabelle seien die Q_{10} unserer Versuche bei Temperaturen von 10 bis 20° bzw. von 15 bis 25° nach bestimmten Zeiten angegeben.

	5 Stdn.	10 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.	96 Stdn.	120 Stdn.	144 Stdn.
10—20°	1,00	1,21	1,20	1,13	1,10	1,10	1,03	1,02
15—25°	1,33	1,44	1,39	1,26	1,18	1,20	1,26	1,21

[1]) *Trautz* und *Volkmann*, Zeitschr. f. physik. Chem. **64**, 53, 1908; *Halban*, ebendaselbst **2**, 169, 1909 (s. die Beispiele: z. B. *Hantsch* und *Smythe*); *Massing*, Pflügers Arch. **156**, 401, 1914.

[2]) Literatur s. *Höber*, Phys. Chemie der Zelle und Gewebe, S. 866. Leipzig 1924.

[3]) *Oskar Hertwig*, Arch. f. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsgesch. **51**, 319, 1898.

[4]) *Pütter*, Zeitschr. f. allgem. Physiol. **16**, 547, 1914; *Kanitz*, Temperatur und Lebensvorgänge. Berlin 1915.

[5]) *Brunner*, Zeitschr. f. physik. Chem. **47**, 56, 1904.

[6]) *Nernst*, ebendaselbst **47**, 52, 1904.

[7]) *Bredig* und *Teletow*, Zeitschr. f. Elektrochem. **12**, 582, 1906; s. auch *Höber*, l. c., S. 340ff., 869ff.

[8]) *Trautz* und *Volkmann*, l. c.

Unsere Versuche zeigen, daß der Q_{10} zwischen 10 und 25° 0 bis 1,44 beträgt, und zwar zwischen 10 bis 20° 1,0 bis 1,21, zwischen 15 bis 25° 1,18 bis 1,44. Diese Untersuchungen beweisen, daß es sich bei unseren Versuchen um reine Diffusionsvorgänge handelt, wie es ja bei der Sekretion der Fall sein muß.

Zusammenfassung.

1. Mit Hilfe der Bestimmung des elektrischen Leitvermögens kann man den Gang der zeitlich ausgeschiedenen Produkte bei Wassertieren verfolgen. Als Beispiel wurde die Pfrille (Phoxinus laevis) gewählt.

2. Das Leitvermögen bleibt bei destilliertem Wasser und Seewasser ohne Fische konstant.

3. Gefütterte Fische scheiden zuerst viel, dann immer weniger Substanzen aus, wobei eine quantitative Bestimmung der einzelnen Substanzen ausgeschlossen ist. Die Ausscheidung der Fische beginnt etwa 2 Stunden nach der Fütterung (siehe Abb. 1).

4. Die Versuche mit Fischen wurden bei Zimmertemperatur und bei einer konstanten Temperatur von 10, 18 und 25° durchgeführt. Je höher die Temperatur, desto reger ist der Stoffwechsel, d. h. desto mehr Substanzen werden ausgeschieden.

5. Die *Van 't Hoff*sche RGT-Regel stimmt für unseren Fall nicht. Die Versuche beweisen vielmehr, daß es sich um reine, physikalisch verlaufende Diffusionsvorgänge handelt. Der Temperaturkoeffizient schwankt zwischen 1 bis 1,44 und ist bei höherer Temperatur etwas höher als bei niedrigerer (zwischen 10 bis 20° 1,0 bis 1,21, zwischen 15 bis 25° 1,18 bis 1,44).

Über die Konstitution der durch Hydrolyse von Rohoryzanin entstehenden β-Säure (Dioxychinolincarbonsäure). II.

Von

Yoshikazu Sahashi.

(Aus dem Suzuki-Biochemical Laboratory of the Institute of Physical and Chemical Research, Komagome, Hongo-ku, Tokyo.)

(Eingegangen am 10. November 1925.)

In der ersten Mitteilung[1]) über die β-Säure $C_{10}H_7NO_4$ hat der Verfasser die Anwesenheit von zwei Hydroxylen und einer Carboxylgruppe in ihrem Molekül festgestellt. Ferner erhielt er Chinolin durch Zinkstaubdestillation. So ist diese Säure als eine Dioxychinolincarbonsäure aufzufassen. $C_9H_4N(OH)_2COOH$. Aber die relative Stelle der Hydroxyle und Carboxylgruppe blieb unentschieden. Daher hat der Verfasser zur Aufklärung dieser Frage das Studium dieser Substanz fortgesetzt und kam zu dem Schluß, daß die β-Säure wahrscheinlich eine 2, 6-Dioxychinolin-4-Carbonsäure ist, welche leicht in ihre tautomere Form in folgender Weise übergeht:

COOH (4) — (6) HO — — OH (2) — N → COO — HO — — CO — NH

β-Säure
2, 6-Dioxychinolin-4-carbonsäure

Tautomere Form

Diese Annahme wird durch folgende Beobachtungen unterstützt:

1. Die β-Säure bildet durch Acetylieren mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat ein Diacetylderivat.

2. Die β-Säure bildet durch Methylieren mit Dimethylsulfat und Alkali in üblicher Weise ein Dimethylderivat. Das letztere bildet ein Bariumsalz von der Zusammensetzung $[(CH_3)_2C_9H_4NO_2 . CO_2]_2Ba$ beim Kochen mit Bariumcarbonat in wässeriger Lösung. Die β-Säure gibt auch in derselben Weise ein Bariumsalz der Formel $(C_9H_6NO_2 CO_2)_2Ba$.

3. Wie oben erwähnt, liefert die β-Säure durch Zinkstaubdestillation Chinolin. Die Ausbeute war aber zu gering für die bestimmte Schlußfolgerung, daß es den Kern der β-Säure bildet. Durch Erhitzen der β-Säure mit Zinkstaub im Wasserstoffstrom über 400^0 wurde etwas mehr Chinolin erhalten, obwohl seine Menge viel geringer als die berechnete war.

---

[1]) Diese Zeitschr. 159, 221, 1925.

4. Erhitzt man die β-Säure über 400°, so spaltet sich Kohlensäure ab und es sublimieren feine gelbe Nadeln vom F.-P. 310°, die als 2,6-Dioxychinolin identifiziert wurden. Die Ausbeute an dieser Substanz

HO— —OH
N

ist auch schlecht. Aber die Existenz des Chinolinkerns in der β-Säure ist dadurch viel wahrscheinlicher geworden.

5. Im Dimethylderivat der β-Säure findet sich eine Methylgruppe als Methoxyl, weil sie durch Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure nach *Zeisels* Methode leicht abgespalten wird, während die andere eine —N-Methylgruppe darstellt, die erst beim Erhitzen mit konzentrierter Jodwasserstoffsäure und Jodammonium auf 250 bis 300° abgespalten wird. Deshalb nimmt der Verfasser an, daß ein Methyl an Stelle 2 in N-Methyl umgewandelt ist:

COOH COOH
$CH_3.O$— —OCH_3 → CH_3O— CO
N N
CH_3

6. Wird die β-Säure in Pyridinlösung mit Benzoesäureanhydrid erhitzt, so gibt sie ein Monobenzoylderivat, nicht aber die Dibenzoylverbindung. Die Hydroxylgruppe in Stelle 2 scheint in der oben erwähnten Weise in die —NH—CO-Gruppe umgewandelt zu sein, so daß sie nicht mehr mit Benzoesäureanhydrid reagiert. Einen Analogiefall findet man beim 2, 8-Dioxychinolin, welches nach *J. Diamant*[1]) mit Essigsäureanhydrid nur ein Monoacetylderivat bildet.

—OH (2) → CO
N NH
OH $(CH_3CO)O$

7. Das Dimethylderivat der β-Säure, in kalter alkalischer Lösung mit $KMnO_4$ behandelt, liefert rote Kristalle, die als ein Isatinderivat von folgender Konstitution identifiziert wurden:

CH_3O— CO
CO
N
CH_3

[1]) M. 16, 765—767.

Da *Friedländer* und *Ostermeier*[1]) aus α-Oxychinolin in derselben Weise **Isatin** erhielten, kann man sich die Reaktion in folgender Weise **vorstellen**:

—OH → CO CO
N NH
α-Oxychinolin Isatin

COOH
C
CH_3O— CH → CH_3O— CO
CO CO
N N
CH_3 CH_3
Dimethyl-β-säure

8. **Mit** starker Salpetersäure erhitzt, lieferte die β-Säure außer **Oxalsäure** eine Nitroverbindung von der Formel $C_8H_4N_2O_9$, die zuerst **vom Verfasser** für *Bernthsens* Juglonsäure gehalten wurde; später hat er **aber durch** Zinkstaubdestillation derselben Pyridin erhalten. Höchst**wahrscheinlich** handelt es sich um 2-Oxy-3-nitropyridin-4, 5, 6-tri**carbonsäure**. Ihre Bildung ist in folgender Weise zu erklären.

COOH COOH
HOOC
HO Konz. HNO_3 HOOC —NO_2
—OH HOOC —OH
N COOH N

COOH
→ COOH HOOC— —NO_2
COOH HOOC— —OH
N
Oxalsäure 2-Oxy-3-Nitropyridin — 4, 5, 6-Tricarbonsäure ($C_8H_4N_2O_9$)

Wenn diese Annahme zutrifft, so muß die Carboxylgruppe der β-**Säure die** Stelle 4 einnehmen.

9. **Die** β-Säure gibt ziemlich starke Thalleiochinreaktion. Da **6-Oxychinolin** dieselbe Reaktion gibt, kann man annehmen, daß eine **Hydroxylgruppe** der β-Säure analog an Stelle 6 haftet.

---

[1]) B. 15, 332.

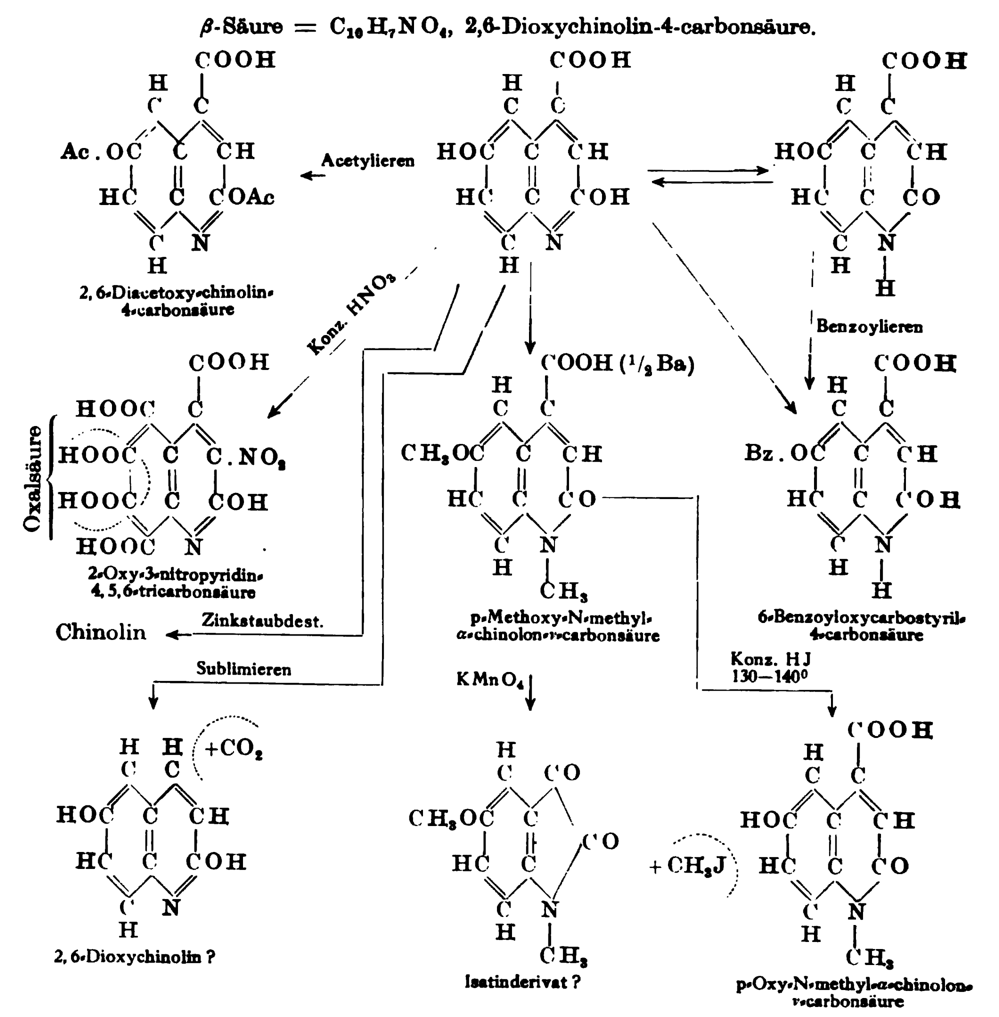
COOH

HO — 6-Oxychinolin   HO — OH — β-Säure

6-Oxychinolin   β-Säure

10. Die obigen Beobachtungen lassen sich in folgender Weise schematisch darstellen.

β-Säure = $C_{10}H_7NO_4$, 2,6-Dioxychinolin-4-carbonsäure.



Die ausführliche Mitteilung wird bald in der Journ. Agricult. chem. Soc. Japan 1, Nr. 12 erfolgen.

Zur Frage des Einflusses von Arsen- und Antimonverbindungen auf die fermentativen Funktionen des Organismus.

III. Mitteilung[1]):

Ändert sich die Wasserstoffzahl des Milieus während der Verdauung des Caseins durch Pepsin in Anwesenheit von Arsen- und Antimonverbindungen?

Von

J. A. Smorodinzew und **N. P. Riabouschinsky.**

(Aus der chemo-therapeutischen Abteilung des Tropeninstituts des Volkskommissariats für Gesundheitswesen in Moskau.)

(Eingegangen am 10. November 1925.)

In der vorigen Mitteilung über den Einfluß einiger Arsen- und Antimonpräparate auf das Pepsin sind wir zu dem Schluß gekommen, daß Brechweinstein (Kalium-antimonyltartrat), Natrium- und Kaliumarsenite wie auch Natriumarseniate die Verdauung von Casein durch Pepsin hemmen. Da die Ionen K und Na keine Rolle bei der verzögernden Wirkung der Arsenpräparate spielen, so äußerten wir die Vermutung, daß diese Wirkung nur auf Rechnung der Anionen geschrieben werden muß. Zur völligen Sicherheit sollte ebenfalls festgestellt werden, ob nicht die aktuelle Reaktion des Milieus unter dem Einfluß dieser Stoffe in irgendwelchem beträchtlichen Maße geändert wird, obgleich es a priori zu erwarten war, daß die puffernden Eigenschaften der Eiweißlösung dieser Veränderung entgegenwirken werden.

Aus von uns unabhängigen Umständen waren wir nicht imstande, diese Versuche seinerzeit anzustellen, und sind erst jetzt dazu gekommen.

Die Untersuchungen von *Smorodinzew* und *Adowa*[2]) zeigten, daß der Säuregrad des Milieus bei der Methode von *Gross* ziemlich genügend gepuffert ist und p_H nach der Verdauung fast unverändert

---

[1]) *J. A. Smorodinzew* und *N. P. Riabouschinsky*, diese Zeitschr. **144**, **26**, **1924**.

[2]) *J. A. Smorodinzew* und *A. N. Adowa*, Bull. de la soc. chim. biol. **7**, **1925**.

bleibt. Andererseits fanden diese Verfasser, daß die elektrometrische Bestimmung des p_H bei dieser Methode mit Erfolg durch die kolorimetrische (mittels Methylviolett) ersetzt werden kann. Nach den Versuchen von *Smorodinzew* und *Lemberg*[1]) findet während der Verdauung von Casein durch Pepsin in Gegenwart von Chininpräparaten keine Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration des Milieus statt. Da wir eine „Vergiftung" der Wasserstoffelektrode durch die As- und Sb-Präparate befürchteten, haben wir auf Grund dieser Versuche kolorimetrische und elektrometrische Bestimmungen des p_H der zu verdauenden Gemische [nach der Methode von *Gross*[2])] ohne Hinzufügung der erwähnten Präparate gemacht, in ihrer Anwesenheit aber maßen wir das p_H nur mittels Methylviolett und eines Puffers, wobei wir dieses letztere auf elektrometrischem Wege (Gaskette) kontrollierten. Dabei konnten wir uns überzeugen, daß Methylviolett dieselben Farbenübergänge vor und nach der Verdauung in Gegenwart von Antimon- und Arsenpräparaten wie auch in ihrer Abwesenheit zeigte.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse unserer Versuche angeführt, aus denen hervorgeht, daß die aktuelle Reaktion des Milieus sich unter diesen Bedingungen nicht ändert, und daß also dieser Umstand keine hemmende Wirkung auf den Verdauungsprozeß ausüben konnte.

Wird das Anion als Urheber der hemmenden Wirkung der Arsenpräparate angegeben, so entsteht von selbst die Frage, ob diese Wirkung auf das Ferment oder das Substrat ausgeübt wird. Die Lösung dieser Frage stellen wir uns als nächste Aufgabe.

Zusammenfassung[3]).

1. Bei der Verdauung des Caseins durch Pepsin nach *Gross*' Methode wird die aktuelle Reaktion bei Hinzufügung der untersuchten As- und Sb-Verbindungen nicht verändert.

2. Der hemmende Einfluß dieser As-Präparate ist ausschließlich durch das Anion bedingt.

3. Die elektrometrische Bestimmung des p_H in Gegenwart von Arsen- und Sb-Verbindungen kann unter den angegebenen Bedingungen durch Methylviolett mit Erfolg ersetzt werden.

---

[1]) *J. A. Smorodinzew* und *C. S. Lemberg*, diese Zeitschr. **162**, 266, 1925.

[2]) *J. A. Smorodinzew*, Die Fermente des Pflanzen- und Tierreichs, 3. Teil, S. 102, 1922. Moskau, russisch.

[3]) In der vorigen Mitteilung, diese Zeitschr. **144**, 30, 1924, ist im Absatz 10 der Zusammenfassung aus Versehen *Casein* statt *Pepsin* angegeben worden.

Tabelle I.

Die Einwirkung von As- und Sb-Präparaten auf die Verdauung des Caseins durch Pepsin nach der Methode von *Gross*. Zu dem zu verdauenden Gemische, bestehend aus 10 ccm 0,1 proz. Casein und 1 ccm Pepsin, wurde 1 ccm des untersuchten Präparats hinzugefügt.

Konzentration des Ferments	Art des Reagenten	Konzentration des Reagenten	Nr. der letzten durchsichtigen Probierröhrchen	Quantität der Pepsineinheiten	p_H im Gemisch	
					Elektrometrische Bestimmung	Colorimetrische Bestimmung
—	Caseinlösung	0,1 proz.	—	—	$0,87_4$*	$0,85_7$
Pepsin Rossicum 2 proz.	H_2O	—	4	80	$0,91_1$**	$0,92_6$
„ „ 2 „	$C_4H_4O_6<{K \atop SbO}$	n/25	—	—	—	$0,92_6$
„ „ 2 „	$C_4H_4O_6<{K \atop SbO}$	n/50	2	20	—	$0,92_6$
1 : 4	H_2O	—	—	—	$0,91_1$	$0,92_6$
1 : 4	$C_4H_4O_6<{K \atop SbO}$	n/50	—	—	—	$0,92_6$
Pepsin Rossicum 2 proz.	Na_2HAsO_3	n/10	2	20	—	$0,92_6$
1 : 2	Na_2HAsO_3	n/10	2	20	—	$0,92_6$
1 : 4	Na_2HAsO_3	n/10	—	—	—	$0,92_6$
Pepsin Rossicum 2 proz.	K_2HAsO_3	n/10	2	20	—	$0,92_6$
1 : 4	K_2HAsO_3	n/10	—	—	—	$0,92_6$
Pepsin Rossicum 2 proz.	Na_2HAsO_4	n/10	2	20	—	$0,92_6$
1 : 4	Na_2HAsO_4	n/10	—	—	—	$0,92_6$

* $\pi = 0,2986$. — ** $\pi = 0,3013$

Tabelle II. Die niederen Grenzen der Konzentrationen der As- und Sb-Präparate, die noch einen hemmenden Einfluß auf die Verdauung von Casein und Pepsin ausüben. Zu dem zu verdauenden Gemische, bestehend aus 10 ccm 0,1 proz. Caseinlösung und 1 cmm Pepsin, wurde je 1 ccm der fallenden Verdünnungen der zu untersuchenden Präparate hinzugefügt.

Benennung des Reagenten	Konzentration		Nr. der ersten durchsichtigen Probierröhrchen	p_H im Gemisch		Verzögernde Konzentration		
	des Reagenten	des Fermenten		Elektrometrische Bestimmung	Colorimetrische Bestimmung	molekulare	Gemisch Proz.	As bzw. Sb im Gemisch Proz.
H_2O	—	1 : 8	Alles verdaut	$0,91_5$	$0,92_6$	—	—	—
$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	n/25	1 : 8	3	—	$0,92_6$	$^1/_{50}$	0,0269	0,0101
Na_2HAsO_3	n/10	1 : 8	4	—	$0,92_6$	$^1/_{40}$	0,0129	0,0052
K_2HAsO_3	n/10	1 : 8	4	—	$0,92_6$	$^1/_{40}$	0,0118	0,0052
Na_2HAsO_4	n/10	1 : 8	4	—	$0,92_6$	$^1/_{40}$	0,01404	0,0052
$C_4H_4O_2<^{K}_{SbO}$	n/25	gekocht	—	—	$0,92_6$	—	—	—

Tabelle III. Versuche mit minimalen Mengen der Präparate. Zu dem zu verdauenden Gemische, bestehend aus 10 ccm 0,1 proz. Casein und 1 ccm Pepsin wurde 1 ccm des untersuchten Präparats hinzugefügt.

Benennung des Reagenten	Konzentration des Reagenten	Konzentration des Reagenten im Gemisch Proz.	As bzw. Sb im Gemisch Proz.	Konzentration des Ferments	p_H im Gemisch		Resultate
					Elektrometrische Bestimmung	Colorimetrische Bestimmung	
H_2O	—	—	—	1 : 8	$0,91_5$	$0,92_6$	Alles verdaut
$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	n/100—n/400	0,01345—0,0033625	0,00505—0,0012625	1 : 8	—	$0,92_6$	" "
Na_2HAsO_3	n/80—n/320	0,0059 —0,001475	0,0026 —0,00056	1 : 8	—	$0,92_6$	" "
K_2HAsO_3	n/80—n/320	0,00702—0,001755	0,0026 —0,00056	1 : 8	—	$0,92_6$	" "
Na_2HAsO_4	n/80—n/320	0,00645—0,0016125	0,0026 —0,00056	1 : 8	—	$0,92_6$	" "
H_2O	—	—	—	1 : 16	$0,92_2$	$0,92_6$	nicht verdaut
$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	n/100—n/400	0,01345—0,0033625	0,00505—0,0012625	1 : 16	—	$0,92_6$	" "
Na_2HAsO_3	n/80—n/320	0,0059 —0,001475	0,0026 —0,00056	1 : 16	—	$0,92_6$	" "
K_2HAsO_3	n/80—n/320	0,00702—0,001755	0,0026 —0,00056	1 : 16	—	$0,92_6$	" "
Na_2HAsO_4	n/80—n/320	0,00645—0,0016125	0,0026 —0,00056	1 : 16	—	$0,92_6$	" "

Über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Diffusion von Farbstoffen in eine Gelatinegallerte.

(Ein Beitrag zum Zellpermeabilitätsproblem.)

Von

Helmut Mommsen.

(Aus dem Institut für animalische Physiologie, Theodor-Stern-Haus, Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 22. November 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Einleitung und Problemstellung.

Bei dem Austausch gelöster Stoffe zwischen der Zelle bzw. Organsystemen und ihrer Umspülungsflüssigkeit spielt nach einer Hypothese von *Bethe*[1]) die Wasserstoffzahl eine große Rolle. *Rhode*[2]) konnte an geeigneten Zellen zeigen, daß Schnelligkeit und Stärke der Anfärbung bei sauren Farbstoffen größer ist im sauren Milieu, bei basischen Farbstoffen im alkalischen Milieu. Ferner ergaben Versuche von *Rhode*[3]) am Frosche, *Pohle*[4]) am Hunde, daß saure Farbstoffe bei Verfütterung schneller und ausgiebiger Darmwand und Nierenepithelien bei gleichzeitiger Säurezugabe passieren, basische Farbstoffe bei Zugabe von Alkali. Auch das Verschwinden von intravenös injizierten Farbstoffen aus der Blutbahn ist in ähnlicher Weise beeinflußbar, wie neue, noch nicht veröffentlichte Experimente an Hunden aus unserem Institut zeigen.

Bei den geschilderten Vorgängen handelt es sich um einen komplexen Prozeß, der teilweise in der Zellmembran, teilweise im Zellinnern sich abspielt. Durch Versuche von *Hofmeister*, *Spiro*, *Bethe*, *Pelet-Jolivet* u. a. wissen wir, daß saure Farbstoffe stärker durch saure, basische durch alkalische Adsorbentien vermutlich auf Grund elektrostatischer Kräfte adsorbiert werden. Bei geeigneter Reaktion der Zellkolloide könnte der Farbstoff entweder in der Membran oder im Zellinnern auf dem Wege der Adsorption angereichert werden. Daß

---

[1]) Diese Zeitschr. 127, 18, 1922.
[2]) Pflügers Arch. 168, 411, 1917.
[3]) Ebendaselbst 182, 114, 1920.
[4]) Ebendaselbst 203, 558, 1924.

beides der Fall sein kann, geht aus *Bethes*[1]) Modellversuchen hervor. Er zeigte in Diffusionsversuchen, bei denen eine Farblösung durch eine Pergamenthülse von destilliertem Wasser getrennt war, daß saure Farbstoffe in saurer Lösung schneller zum Konzentrationsausgleich kamen als in neutraler oder alkalischer Lösung, wobei sich im ersteren Falle die Hülse stärker anfärbte; umgekehrt verhielten sich basische Farbstoffe. Wurde das destillierte Wasser im Innern der Hülse durch eine Kolloidlösung, z. B. Rinderserum, ersetzt, um so ein Modell einer Zelle herzustellen, so kam es im Innern der Hülse zu einer starken Farbstoffspeicherung, wenn ein saurer Farbstoff in saurem Milieu verwandt wurde, während bei alkalischer Reaktion eine Speicherung vermißt wurde.

Unentschieden blieb dabei, ob der Durchtritt einer größeren Farbmenge in der Zeiteinheit tatsächlich auf Adsorption, „besserer Löslichkeit" des permeierenden Stoffes in der Membransubstanz im Sinne von *L'Hermite*[2]), oder auf einer Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit oder auf beiden Prozessen beruht, wobei beide im gleichen oder im entgegengesetzten Sinne wirksam sein könnten. Von vornherein ist wahrscheinlich, daß die Adsorption der treibende Faktor ist, daß also dann, wenn der Farbstoff stark in der Membran angereichert ist, mehr Moleküle in der Zeiteinheit die Membran passieren, daß jedoch die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen Moleküle bei der betreffenden Reaktion diffundieren, herabgesetzt ist. Die Annahme einer Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit in diesem Sinne ergeben folgende Überlegungen:

1. Nach der *Exner-Euler*schen[3]) Formel $D = \frac{K}{\sqrt{M}}$ (D = Diffusionskoeffizient, K = Konstante, M = Molekulargewicht) nimmt die Diffusionsgeschwindigkeit mit Zunahme des Molekulargewichts und nach der von *Einstein*[4]) entwickelten Vorstellung mit Zunahme der Teilchengröße ab.

2. Die von den zitierten Autoren und mir zu den Versuchen benutzten Farbstoffe haben in mehr oder weniger hohem Maße den Charakter von Kolloiden.

Die meisten sauren Farbstoffe flocken aus in Säuren, die basischen in Alkalien. Eine Sonderstellung nimmt Rhodamin B (amphoterer Farbstoff) ein, das noch besonders besprochen wird. Das Ausflocken ist nicht allein auf das Freimachen der schwerer löslichen Farbsäure oder -base zurückzuführen, wie *Freundlich*[5]) wenigstens für Eosin und Safranin meint, da sonst die Aus-

[1]) Zitiert S. 77.
[2]) Ann. de Chim. et de Phys. **43**, 420, 1855.
[3]) Wiedemanns Ann. d. Phys. **63**, 273, 1897.
[4]) Zitiert nach *Freundlich*, Kapillarchemie, 2. Aufl. 1922, S. 478 u. folg.
[5]) Kapillarchemie, 2. Aufl., S. 898, 1922.

flockung bei viel geringeren Elektrolytzusätzen erfolgen müßte. Daß es sich auch bei Eosin und Safranin um einen kolloidchemischen Vorgang handelt, macht außerdem die Fällbarkeit durch Salze [*Teague* und *Buxton*[1]), *Höber* und *Kempner*[2])], ferner das von *Bethe*[3]) studierte Verhalten im elektrischen Potentialgefälle wahrscheinlich. Bei dem Zusatz von z. B. HCl zu einem sauren Farbstoff werden die Teilchen vermutlich entladen und treten zu größeren Komplexen zusammen, bis sie schließlich ausfallen. *Traube* und *Köhler*[4]), die den unseren ähnliche, noch zu besprechende Versuche machten, untersuchten einige Farbstofflösungen ultramikroskopisch vergleichsweise in neutraler und saurer, bzw. alkalischer Lösung und fanden, daß saure Farbstoffe durch Säurezusatz grobdisperser werden. Diffusionsversuche von Farbstoffen in Fließpapier unter steigendem Salzzusatz machten bereits *Teague* und *Buxton*[1]) mit Eosin und Methylenblau. Mit zunehmender Salzkonzentration wurden die Diffusionshöhen kleiner; in der Erklärung legen die Autoren das Hauptgewicht auf die durch den Salzzusatz bedingte Vergröberung der Teilchen und die daraus wieder folgende verstärkte Adsorption, die das Vordiffundieren hindern soll. Somit scheint es wahrscheinlich, daß saure Farbstoffe durch Säurezusatz, basische durch Beigabe von Alkali grobdisperser werden.

Wir können also nach der *Exner-Euler*schen Formel von vornherein erwarten, daß die von *Bethe* und seinen Mitarbeitern an toten und lebenden Membranen beobachteten Änderungen der Durchlässigkeit infolge von Reaktionswechsel nicht durch entsprechende Veränderungen der Diffusionsgeschwindigkeit zu erklären sind, daß diese vielmehr im entgegengesetzten Sinne wirken wird.

Zur experimentellen Prüfung unserer Frage stellten wir Diffusionsversuche von Farbstoffen in Gelatinegallerten von wechselndem p_H an.

Methodik und Kritik derselben.

Zu meinen Versuchen wählte ich folgende Farbstoffe:

Eosin, gelblich, 489[5]), Croceinorange G. 23, Safranin T 611, Capriblau 556, Rhodamin B 479.

Nach Versuchen von *Herzog* und *Polotzki*[6]) zeigen die Diffusionskonstanten dieser Farbstoffe, die nach Eindringen in eine 5proz. Gelatinegallerte in verschiedenen Schichten bestimmt wurden, recht konstante Werte. Es ist also nicht anzunehmen, daß sie in unvorhergesehener Weise mit der Gallerte reagieren. Ich arbeitete mit folgender Versuchsmethodik: Von einer mit n/30 bis n/40 HCl bereiteten 10proz. Gelatine ausgehend, stellte ich mir durch Verdünnen mit gleichen Mengen destillierten Wassers 5proz. ungefärbte und mit m/500 Farblösung 5proz. gefärbte Gelatine her,

---

1) Zeitschr. f. phys. Chem. **60**, 1907.

2) Diese Zeitschr. **11**, 1908.

3) Kolloid-Zeitschr. **27**, 11, 1920.

4) Intern. Zeitschr. f. physik.-chem. Biol. **2**, 197, 1916.

5) Die hinter den Farbstoffen vermerkten Zahlen bedeuten die laufenden Nummern in der tabellarischen Übersicht organischer Farbstoffe von *Schultz* und *Julius*, 4. Aufl. Berlin 1902.

6) Zeitschr. f. phys. Chem. **87**, 449, 1914.

die also den Farbstoff in einer Verdünnung von m/1000 enthielt. Beide Gelatinen müssen annähernd das gleiche p_H haben; die geringen Abweichungen der Farbstofflösungen von der Neutralität können gegenüber den zugesetzten Mengen an Säure oder Alkali vernachlässigt werden. Das in der ungefärbten Gelatine mit Michaelisindikatoren gemessene p_H betrug 4,6 bis 4,8, in einem Versuch 4,2. In gleicher Weise bereitete ich mir mit n/30 bis n/40 NaOH ungefärbte und gefärbte alkalische Gelatine vom p_H 8,3 bis 8,8. In Vorversuchen war geprüft, daß die Farbstoffe bei den angewandten Wasserstoffzahlen nicht ausflockten. Nach Sterilisation der Gelatinelösungen wurden 30 ccm ungefärbte Gelatine in gleichmäßig zylindrische Röhrchen von etwa 20 mm lichter Weite eingefüllt und nach Erstarren in Eis mit 10 ccm Farbgelatine der gleichen Reaktion überschichtet. Die Versuchsröhren standen im Eisschrank.

Eine weitere Versuchsreihe wurde so angesetzt, daß die Diffusion aus einer wässerigen Farbstofflösung in die Gallerte erfolgte. Um eine Farbstofflösung zu erhalten, die mit der Gelatine und den in ihr befindlichen Zusätzen wenigstens annähernd im Gleichgewicht war, wurde 5proz. saure und alkalische Gelatine, die in der beschriebenen Weise bereitet war, zunächst mit destilliertem Wasser überschichtet; nach zweitägigem Stehen im Eisschrank wurde das Wasser abgegossen und das p_H gemessen, das ungefähr dem der Gelatine entsprach. Darauf dampfte ich zur Hälfte ein und füllte wieder mit m/500 Farbstofflösung auf. Ich hatte also wieder m/1000 Farbstofflösung in einer Flüssigkeit, die sich mit der Gallerte annähernd im Gleichgewicht befand. Im übrigen erfolgte das Ansetzen der Röhrchen in der beschriebenen Weise.

Die Vorbehandlung der Gelatinen erfolgte in allen Versuchen möglichst gleichmäßig, da die Struktur der Gallerten durch Kochen, verschieden schnelles Erstarren verändert wird (*Zsigmondy*, *Liesegang*, *P. v. Schröder*).

Der *Diffusionsweg* der Farbstoffe wurde täglich von außen von der mit Markierung versehenen Grenze zwischen den übereinander geschichteten Gelatinen, bzw. Gelatine und wässeriger Farbstofflösung gemessen; trotz der besonders gegen Ende der Versuche unscharfen Farbgrenze gelingt es, nach einiger Übung Parallelmessungen zu erzielen, die selten mehr als $\pm$ 2 Proz. differieren.

Zur Feststellung der in die Gelatine hineindiffundierten *Mengen* wurde der ganze Gelatinezylinder durch kurzes Eintauchen in heißes Wasser herausgelöst, und der bei Versuchsbeginn darüber geschichtete Farbgelatineblock abgebrochen, was meist leicht gelingt. Erfolgte die Diffusion aus wässeriger Farbstofflösung, so wurde diese einfach abgegossen und dann der Gelatinezylinder herausgelöst. Die eingedrungenen Farbstoffmengen wurden nach Einschmelzen und Verdünnen der Gelatine im *Krüss*chen Kolorimeter mit *Lummer-Brodhuhn*schem Prisma bestimmt. Es wurde streng darauf geachtet, daß gegen eine Vergleichslösung von gleichem p_H und gleichem Gelatinegehalt kolorimetriert wurde. Die Versuche, bei denen die Diffusion aus Gelatine in Gelatine erfolgte, nenne ich im folgenden kurz „Gallertversuche", während die Versuche, bei denen der Farbstoff aus wässeriger Lösung eindrang, „Wasserversuche" heißen sollen.

Gegen die Versuchsanordnung wäre einzuwenden, daß die Gelatine durch die zugesetzten Säure- und Alkalimengen in ihrem Quellungszustand verändert wird, daß die Farbstoffe daher nicht unter gleichen Bedingungen diffundieren. Tatsächlich hat die alkalische Gelatine einen höheren Erstarrungspunkt, eine kürzere Gelatinierungszeit, ist härter und sieht im

durchfallenden Lichte heller aus, was für Verschiedenheiten in Größe und Quellungszustand der Gelmizellen spricht. Eine eingehende Erörterung der Frage erübrigt sich, da *Liesegang*[1]) die alten, viel zitierten Versuche von *Bechold* und *Ziegler*[2]), daß quellungsfördernde Stoffe die Diffusion erleichtern, entquellende sie hemmen, einer berechtigten Kritik unterzogen hat. *Liesegang* weist nach, daß *Becholds* Annahme nur dann richtig ist, wenn die quellungsfördernden Stoffe zu einer teilweisen Verflüssigung der Gelatine führen. Dies war bei meinen Versuchen niemals der Fall.

Literatur.

Ähnliche Versuche, wie die beschriebenen, mit einigen anderen Farbstoffen machten bereits *Traube* und *Köhler*[3]). Sie bestimmten jedoch nur die Diffusionswege in Versuchen, bei denen Farbstoff aus wässeriger Lösung unter steigendem, zum Teil recht erheblichem Säurezusatz in die gleiche Gelatine diffundierte. p_H-Messungen wurden nicht vorgenommen, ebenso die eingedrungenen Mengen nicht bestimmt. Sie kamen bei diesen Versuchen trotz nicht erschöpfender Methodik im wesentlichen zu den gleichen Resultaten, wie wir.

Herzog und *Polotzki*[4]), die in sehr eingehenden Studien die Diffusionskoeffizienten der Hydro- und Gallertdiffusion von Farbstoffen verglichen, prüften in einigen Versuchen auch die Frage, ob Säure- oder Alkalizusatz einen Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit hat; sie kamen zu negativen Resultaten, offenbar deshalb, weil sie zu geringe Zusätze an Säure und Alkali wählten, die das p_H der stark puffernden Gelatine nicht oder kaum ändern konnten.

Versuche.

Die Resultate der Messungen der Diffusionswege von „Gallert“- und „Wasserversuchen“ (s. Methodik) sind in den Tabellen I und II zusammengestellt. Eine bessere Übersicht ergeben die Abb. 1 bis 3. Wie erwartet, ist die Diffusionsgeschwindigkeit der beiden sauren Farbstoffe Eosin und Croceinorange im sauren System, der basischen Farbstoffe Capriblau und Safranin im alkalischen System herabgesetzt. So beträgt die Geschwindigkeitsdifferenz beim Eosin rund 50 Proz.; die Diffusion erfolgt im sauren System also nur halb so rasch. Bei den übrigen Farbstoffen ergeben sich Unterschiede von rund 25 Proz.

Beim Rhodamin zeigen sich nur geringe Differenzen, und zwar verhält es sich so, als ob die Teilchengröße in alkalischer Lösung kleiner wäre, d. h. als ob ein saurer Farbstoff vorläge, obwohl es gewöhnlich unter die basischen Farbstoffe gezählt wird, da es als Chlorid in den Handel kommt. Eine Erklärung für das Verhalten des Rhodamins ist in seiner Konstitution

[1]) Chemische Reaktionen in Gallerten, 2. Aufl., 1924.
[2]) Zeitschr. f. phys. Chem. 56, 105, 1906.
[3]) Zitiert S. 79.
[4]) Zeitschr. f. phys. Chem. 87, 449, 1914.

Tabelle I. Diffusionswege der *Gallertversuche* (Diffusion aus Farbgelatinegallerte in Gelatine).

Eosin S 24. X. bis 20. XI. 1924			Croceinorange S 15. X. bis 28. X. 1924			Capriblau B 8. X. bis 21. X. 1924			Safranin B 24. X. bis 4. XI. 1924			Rhodamin 8. X. bis 20. X. 1924		
Nach Stunden	Diffusionsweg in mm		Nach Stunden	Diffusionsweg in mm		Nach Stunden	Diffusionsweg in mm		Nach Stunden	Diffusionsweg in mm		Nach Stunden	Diffusionsweg in mm	
	Saure Gel. p_H 4,6	Alk. Gel. p_H 8,35		Saure Gel. p_H 4,4	Alk. Gel. p_H 8,4		Saure Gel. p_H 4,6	Alk. Gel. p_H 8,5		Saure Gel. p_H 4,6	Alk. Gel. p_H 8,35		Saure Gel. p_H 4,6	Alk. Gel. p_H 8,5
20,8	3,5	7,6	23,5	7,0	9,8	16,5	9,3	8,4	20,8	9,2	7,0	16,5	9,7	10,0
45,3	7,5	15,0	48,8	10,1	14,1	40,3	15,9	13,4	45,3	19,5	14,6	40,3	15,1	15,7
68,3	8,9	17,6	71,0	12,1	17,7	65,3	20,4	16,4	68,3	22,5	17,9	65,3	20,0	21,1
92,0	10,0	19,5	96,0	16,8	23,2	112,3	26,8	20,4	92,0	25,8	19,3	112,3	26,7	29,0
116,3	11,0	22,2	142,0	19,9	28,9	136,5	29,6	23,0	116,3	27,9	21,1	136,5	30,8	32,2
140,0	11,7	24,0	166,0	21,5	30,8	163,5	33,1	25,2	140,0	31,0	23,0	163,5	33,3	34,9
189,3	13,1	26,3	194,3	24,0	33,6	185,3	35,5	27,3	189,3	34,9	26,1	185,3	34,9	38,0
214,8	14,0	28,8	213,8	25,7	36,1	210,8	37,3	28,5	214,8	37,2	28,9	210,8	37,8	41,0
236,5	15,0	30,9	262,5	29,2	40,1	232,8	38,3	29,5	236,5	39,8	30,8	232,8	39,9	42,3
620,5	22,7	47,4	285,5	30,0	41,5	281,8	43,6	32,5	—	—	—	281,8	43,5	46,8
—	—	—	—	—	—	303,5	45,3	33,2	—	—	—	—	—	—

Tabelle II. Diffusionswege der *Wasserversuche* (Diffusion aus wässeriger Farbstofflösuug in Gelatine).

Eosin S 22. VIII. bis 1. IX. 1924			Croceinorange S 22. VIII. bis 1. IX. 1924			Capriblau B 8. X. bis 22. X. 1924			Safranin B 18. VIII. bis 29. VIII. 1924			Rhodamin 8. X. bis 22. X. 1924		
Nach Stunden	Diffusionsweg in mm		Nach Stunden	Diffusionsweg in mm		Nach Stunden	Diffusionsweg in mm		Nach Stunden	Diffusionsweg in mm		Nach Stunden	Diffusionsweg in mm	
	Saure Gel. p_H 4,65	Alk. Gel. p_H 8,35		Saure Gel. p_H 4,65	Alk. Gel. p_H 8,35		Saure Gel. p_H 4,6	Alk. Gel. p_H 8,5		Saure Gel. p_H 4,2	Alk. Gel. p_H 8.8		Saure Gel. p_H 4,6	Alk. Gel. p_H 8,5
15,0	4,1	8,5	15,0	6,2	8,6	19,0	11,0	10,5	12,0	8,6	5,4	19,0	11,2	12,0
64,0	8,6	17,4	64,0	14,3	18,1	43,5	16,4	16,1	36,5	18,0	13,8	43,5	17,7	18,1
87,5	9,8	20,1	87,5	13,5	21,7	68,3	20,3	19,0	60,0	22,0	16,3	68,3	22,1	23,0
113,5	11,0	23,2	113,5	19,4	25,0	115,5	26,5	24,2	83,5	26,3	18,1	115,5	29,2	31,0
135,5	12,0	25,0	135,5	20,8	28,5	139,8	30,4	26,0	107,5	29,5	20,4	139,8	32,7	33,3
161,5	12,8	26,9	161,5	22,8	30,8	166,8	32,2	28,1	156,5	37,0	24,5	166,8	35,7	36,9
183,5	14,2	29,0	183,5	24,8	32,9	188,8	34,6	—	180,0	39,1	26,0	188,8	37,6	39,5
209,5	15,0	30,5	209,5	26,5	33,9	214,0	38,3	31,0	206,3	41,8	27,5	214,0	41,0	42,9
231,0	15,6	31,6	231,0	27,6	34,7	236,3	40,6	32,4	228,3	43,9	29,1	236,3	43,2	45,2
—	—	—	—	—	—	285,0	43,7	33,7	254,0	45,8	30,2	285,0	47,0	50,1
—	—	—	—	—	—	306,8	47,9	36,5	—	—	—	306,8	50,0	52,4

und in Versuchen von *Bethe*[1]) zu sehen. Das Rhodamin enthält eine Carboxylgruppe, welche ihm deutlich saure, mit der Gaskette nachweisbare Eigenschaften verleiht. **Im elektrischen** Potentialgefälle **wandert es in saurer Lösung rein kathodisch, in alkalischer Lösung vorwiegend anodisch** und wenig kathodisch. **Es ist also ein partiell amphoterer Elektrolyt. Daher ist es sehr** gut **möglich, daß bei den** gewählten p_H die Farbstoffteilchen **in alkalischer Lösung zum Teil eine** geringere Größe **haben als in saurer.**

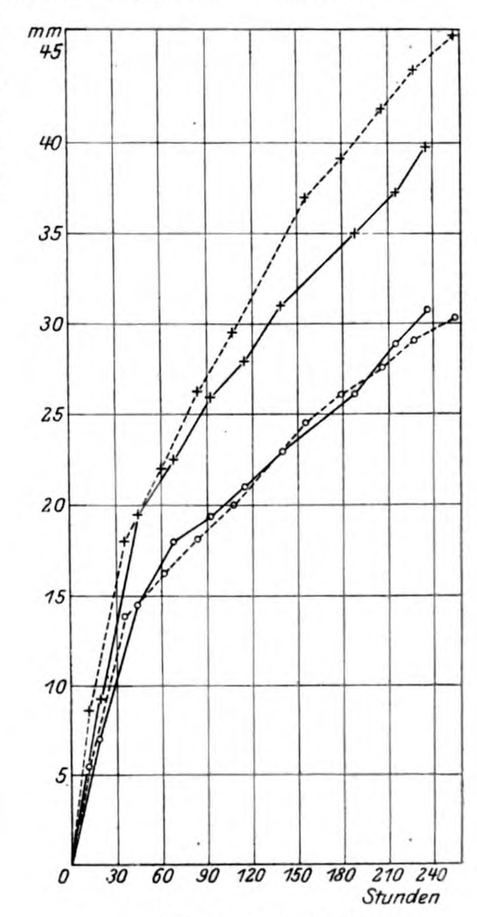


Abb. 1. Eosin (sauer).

Abb. 2. Safranin (basisch).

Graphische Darstellung der Diffusionswege in Millimetern (Ordinate) zu den Zeiten in Stunden (Abszisse); Werte der Gallertversuche ausgezogen: , Werte der Wasserversuche gestrichelt: -----, im sauren System +— +, im alkalischen System ○——○.

Der Vergleich der Kurven der Gelatineversuche mit den Wasserversuchen ergibt, daß die Diffusionsgeschwindigkeit bei Wasserversuchen meist, im Beginn stets, größer ist, die Differenz der Diffusionsgeschwindigkeiten jedoch nicht wesentlich geändert ist (vgl. auch Tabelle III, Spalte 7).

[1]) Zitiert S. 79.

Bei Betrachtung der in die Gelatine hineindiffundierten *Mengen* ist Folgendes zu beachten: Wie ich in der Einleitung erwähnte, ist bekannt, daß saure Farbstoffe stärker an sauren, basische an alkalischen Adsorbentien haften. Durch die Versuchsanordnung, daß der Farbstoff aus einer Gelatinegallerte in eine solche von gleichem p_H diffundiert, sollte erreicht werden, daß die Adsorption als treibender Faktor der Diffusion ausgeschaltet wird. Der vordringende Farbstoff findet auf seiner Diffusionsbahn überall die gleichen Adsorptionsbedingungen vor, wie er sie ursprünglich in dem darüber geschichteten Farbgelatinezylinder hatte. Im Gegensatz zu den Gallertversuchen kommen bei den Wasserversuchen die Kräfte der Adsorption zu denen der Diffusion hinzu. So wird z. B. die saure Gelatine einen sauren Farbstoff in viel stärkerem Maße an sich reißen als die alkalische Gelatine.

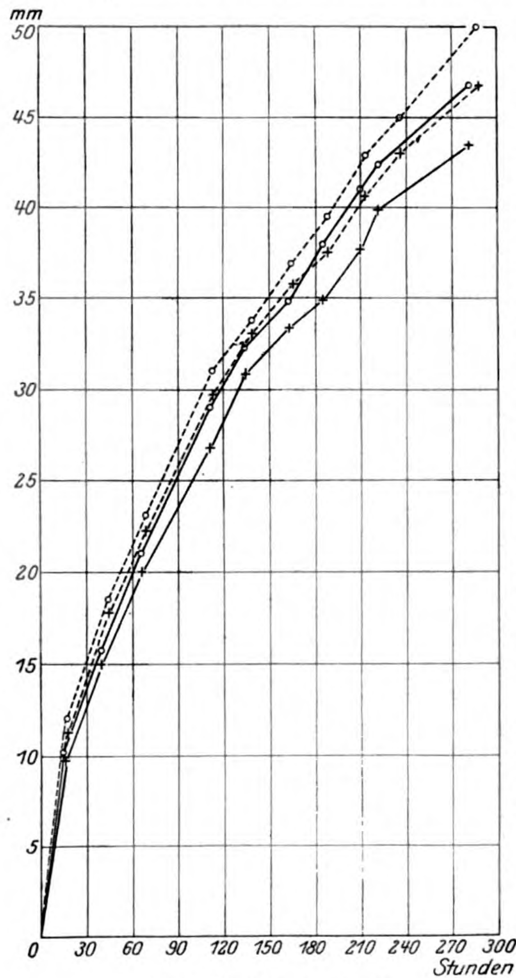


Abb. 3. Rhodamin (amphoter).
Graphische Darstellung der Diffusionswege in Millimetern (Ordinate) zu den Zeiten in Stunden (Abszisse); Werte der Gallertversuche ausgezogen: ——, Werte der Wasserversuche gestrichelt: ·······, im sauren System +—— +, im alkalischen System ○——○.

In den Stäben 4 und 5 der Tabelle III sind die absoluten Werte der übergegangenen Farbstoffmengen aufgeführt. Es zeigt sich, daß ausnahmslos in Wasserversuchen mehr Farbstoff in die Gallerte eingedrungen ist. Das ist leicht verständlich, da aus wässeriger Lösung der Farbstoff stärker adsorbiert wird. Um nun aber in übersichtlicher Weise die vergleichende Betrachtung der einerseits bei saurer, andererseits bei alkalischer Gallertreaktion eingedrun-

genen Farbstoffmengen durchzuführen, sind folgende Quotienten gebildet worden:

Tabelle III. Mengenbestimmungen.

1	2	3	4	5	6	7
Farbstoff		Nach Tagen	In die Gelatine eingedrungene Farbstoffmengen in mg		$\frac{M_S \cdot 100}{M_a}$	$\frac{W_S \cdot 100}{W_a}$
			Saure Gel.	Alk. Gel.		
Eosin . .	Gallertversuch	25,8	0,449	0,856	52,0	47,9
	Wasserversuch	9,7	3,930	2,020	194,4	49,6
Crocein-orange	Gallertversuch	12,1	0,874	0,677	129,0	72,2
	Wasserversuch	9,8	2,100	1,040	202,7	79,4
Rhodamin	Gallertversuch	11,8	1,070	1,020	104,0	93,1
	Wasserversuch	12,8	1,490	1,450	103,9	94,9
					$\frac{M_a \cdot 100}{M_S}$	$\frac{W_a \cdot 100}{W_S}$
Capriblau	Gallertversuch	12,8	0,945	0,531	56,4	74,9
	Wasserversuch	13,8	1,100	0,904	81,9	77,2
Safranin	Gallertversuch	9,9	0,645	0,554	85,8	76,7
	Wasserversuch	10,8	1,240	1,520	122,7	66,5

Saure Farbstoffe[1]: $\frac{M_S \cdot 100}{M_a}$ und $\frac{W_S \cdot 100}{W_a}$.

Basische Farbstoffe: $\frac{M_a \cdot 100}{M_S}$ und $\frac{W_a \cdot 100}{W_S}$.

M_S = Farbstoff in Milligrammen, der in saure Gelatine eingedrungen ist.

M_a = Farbstoff in Milligrammen, der in alkalische Gelatine eingedrungen ist.

W_S = Diffusionsweg, der in saurer Gelatine zurückgelegt ist.

W_a = Diffusionsweg, der in alkalischer Gelatine zurückgelegt ist.

Ein Vergleich der in Tabelle III, Stab 6, aufgeführten Mengenquotienten der Gallert- und Wasserversuche zeigt, daß außer beim Rhodamin der Mengenquotient der Wasserversuche über dem der Gallertversuche liegt. Im Gegensatz weichen die Wegquotienten (Spalte 7) der einzelnen Farbstoffe verhältnismäßig wenig voneinander ab. Es hat also bei sauren Farbstoffen die saure, bei basischen die alkalische Gelatine aus wässeriger Lösung mehr Farbstoff an sich gerissen als aus Gallertlösung. Andererseits ist es für die Diffusionsgeschwindigkeit ziemlich belanglos, ob der Farbstoff aus wässeriger oder gallertiger Lösung diffundiert.

[1]) Rhodamin ist bei den sauren Farbstoffen geführt, da bei ihm in unseren Versuchen die sauren Eigenschaften stärker hervortreten als die basischen.

Wieweit es gelungen ist, die Adsorption als treibenden Faktor der Diffusion auszuschalten, lehren Vergleiche zwischen den Weg- und Mengenquotienten der Gallertversuche. Bei völliger Aufhebung der Adsorption müssen offenbar die eingedrungenen Mengen den Diffusionswegen proportional sein. Je langsamer ein Farbstoff diffundiert, desto weniger dringt er in die Gelatine ein. Vergleicht man jedoch die pro 1 g Gelatine eingedrungene Farbstoffmenge einerseits der sauren, andererseits der alkalischen Gelatine, so müßte diese Menge gleich sein. Es wäre dann bei sauren Farbstoffen:

$$\frac{M_S \cdot 100}{M_a} = \frac{W_S \cdot 100}{W_a},$$

bei basischen Farbstoffen:

$$\frac{M_a \cdot 100}{M_S} = \frac{W_a \cdot 100}{W_S}.$$

Dies ist in Annäherung erreicht beim Eosin und Safranin. Aber auch bei diesen beiden Farbstoffen, ferner beim Rhodamin, am stärksten beim Croceinorange liegt der Mengenquotient über dem Wegquotienten. Abweichend verhält sich nur das Capriblau. *Mark*[1]) fand nun an verschiedenen Systemen, daß es eine Sättigung der Adsorption gibt. Die Kurve der Adsorptionsisothermen läuft von einer bestimmten Konzentration an der Abszisse parallel. Es ist nun vorstellbar, daß die Kraft, mit der die Teilchen am Adsorbens festgehalten werden, mit der Annäherung an den Sättigungspunkt abnimmt. In dem vorliegenden Falle hieße es, daß bereits mit Farbstoff angereicherte Gelatine nicht mit derselben Kraft adsorbiert wie ungefärbte Gelatine. Dort, wo die Kräfte der Adsorption an sich gering sind, für saure Farbstoffe im alkalischen System, für basische im sauren, wird die Störung des Adsorptionsgleichgewichts gering sein, jedoch dort sich bemerkbar machen, wo stark adsorbiert wird, bei sauren Farbstoffen in saurer, bei basischen in alkalischer Gelatine. Infolgedessen überwiegen bei sauren Farbstoffen die Mengen, bezogen auf die Steighöhen, in der sauren, bei basischen Farbstoffen in der alkalischen Gelatine. Im Gegensatz hierzu scheint die Adsorption des basischen Farbstoffs Capriblau derart fest zu sein, daß im alkalischen System relativ weniger Farbstoff vordringen konnte[2]). Versuche mit wechselndem Farbstoffgehalt des übergeschichteten Farbgelatineblocks könnten hier weitere Klärung bringen.

Schlußfolgerungen und Zusammenfassung.

Meine Versuche machen wahrscheinlich, daß die von *Bethe* und seinen Mitarbeitern beobachteten Änderungen der Membrandurch-

---

[1]) Zitiert nach *Höber*, Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe, 5. Aufl., S. 165, 1922.

[2]) Capriblau verhält sich auch nach *Bethes* (diese Zeitschr. **127**, 20, 1922) Untersuchungen bei der Dialyse durch eine Pergamenthülse abweichend. Im Gegensatz zu anderen untersuchten basischen Farbstoffen erfolgt beim Capriblau der Ausgleich zwischen in der Hülse befindlichem Wasser und außen befindlicher Farbflüssigkeit am raschesten in saurer Lösung. *Bethe* beobachtete, daß das Pergament in alkalischer Lösung außerordentlich stark angefärbt war, und vermutete Farbniederschläge, die die Poren der Membran verstopften. Nach meinen Versuchen scheint es nun so zu sein, daß der Farbstoff durch die Kräfte der Adsorption derart intensiv festgehalten wurde, daß die Diffusion gehemmt war.

lässigkeit infolge von Reaktionswechsel auf dem Wege veränderter Adsorption zustande kommen, nicht aber durch Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit. Diese wird zwar auch beeinflußt, jedoch in dem Sinne, daß sie den beobachteten Erscheinungen entgegenwirkt, wie meine Versuche klar zeigen und die *Exner-Euler*sche Formel bereits vermuten ließ; denn unter den Umständen, unter welchen die Gesamtmenge an Farbstoff, die durch eine Membran hindurchtritt, größer wird, wird die Diffusionsgeschwindigkeit des einzelnen Farbstoffteilchens herabgesetzt. Der Effekt eines reichlicheren Durchtritts wird dadurch erzielt, daß die Membran stark mit Farbstoff beladen ist, und die einzelnen Farbstoffteilchen in größerer Anzahl bei herabgesetzter Diffusionsgeschwindigkeit die Membran passieren. Zu diesem Schluß berechtigen folgende Befunde:

1. Die Diffusionsgeschwindigkeiten von Farbstoffen, die einerseits in saure, andererseits in alkalische Gelatine eindringen, werden so beeinflußt, daß saure Farbstoffe durch die saure, basische durch die alkalische Gallerte verlangsamt werden.

2. Dies Resultat wird in gleicher Weise erzielt, einerlei, ob der Farbstoff aus gallertiger oder wässeriger Lösung diffundiert.

3. Die eingedrungenen *Mengen* sind in *den* Versuchen, bei welchen die Diffusion aus Gallertlösung erfolgt, den Diffusionswegen annähernd proportional.

4. Hingegen sind in der zweiten Reihe von Versuchen — Diffusion aus wässeriger Lösung — die eingedrungenen Mengen, bezogen auf die Steighöhen, bei sauren Farbstoffen in der sauren, bei alkalischen in der alkalischen Gelatine größer. Eine Erklärung für dies Verhalten wird in den geänderten Verhältnissen der Adsorption gesucht.

5. Die Versuche finden zur Stützung einer Hypothese von *Bethe* über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Permeabilität von Zellmembranen Anwendung.

Für die Anregung zu dieser Arbeit und das ihr entgegengebrachte rege Interesse möchte ich Herrn Prof. *Bethe* meinen wärmsten Dank sagen.

Diese Arbeit wurde mit Hilfe der Rockefeller Foundation ausgeführt, wofür ich auch an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

Neue Methoden in der Mikro-Physiko-Chemie.

Von

R. Keller (Prag).

(Eingegangen am 23. November 1925.)

Aufmerksamen Lesern dieser Zeitschrift sind meine Versuche bekannt, mit Hilfe von elektrisch geladenen Farbstoffpartikelchen und mit Hilfe anderer davon unabhängiger Kontrollmethoden die Mikroelektrochemie der lebenden Zelle in groben Umrissen aufzudecken. In der letzten Zeit ist es gelungen, diese Methodik zu verbessern und sicherer zu machen. Insbesondere *Reinhold Fürth*, *Josef Gicklhorn* u. a. haben Erfolge erzielt, die beachtenswerte Aussichten für die Zukunft eröffnen. Die betreffenden Versuche sind teils noch unveröffentlicht, teils in zoologischen und anderen speziellen Zwecken dienenden Zeitschriften erschienen, es sei deshalb gestattet, in einer gedrängten Darstellung hervorzuheben, was für die chemische Physiologie des lebenden Organismus bemerkenswert erscheint.

Ausgangspunkt der Untersuchungen war der Gedanke, daß die gewöhnliche Laboratoriumschemie und Laboratoriumsanalytik nicht einfach auf lebende Zellen übertragen werden kann, da in den lebenden Organen vor allem elektrische Ströme, elektrische statische Ladungen die kleinsten sichtbaren Zellteile durchsetzen und dieser Faktor allein die Analysenregeln unter Umständen umkehren kann. Um eines der bekanntesten Beispiele zu nennen, die Salzsäureproduktion der Magenschleimhaut, so kann man in jedem Lehrbuch der Physiologie, auch in den neuesten Auflagen, lesen, daß Silberlösungen in den Belegzellen der Fundusschleimhaut des Magens Chlorsilber niederschlagen, das sich am Licht schwärzt, daß also dort die Stelle der Salzsäureproduktion des Magens ist. Mit Hilfe meiner mikroelektrischen Methodik hat meine Mitarbeiterin *Winternitz*[1]) schon 1917 festgestellt, daß die Belegzellen die auffallendsten Kathoden des Magens sind, sie ziehen das zur Kathode wandernde Silberion an sich, ebenso wie Eisen, Nickel, Kobalt und andere Metalle; die Tatsache, daß sich in den Belegzellen das Silberion anreichert, entladet und speichert, ist keineswegs eine Reaktion auf Chlor oder Salzsäure, sondern im Gegenteil ein Hinweis auf relative Chlorfreiheit. Die Belegzellen sind in Wirklichkeit die alkalischsten Punkte der Magenschleimhaut, welche, wie man längst weiß, angefüllt ist mit kochsalzreicher Lymphe, kochsalzreichem Blute, salzsäurereichem Magensaft. Es war auch auf Grund der alten Methodik keineswegs einwandfrei, mit Silbernitrat wie im Reagenzglas auf Chlor-

[1]) Die Elektrizität in der Zelle, 1. Aufl.

wasserstoff suchen zu wollen, was auch von einsichtigen Kritikern schon viel früher hervorgehoben wurde. Diese und andere Analysen gleichen Wertes halten sich aber in den Lehrbüchern weiter. Neuestens haben nun einige genaue Untersucher, zuerst *Schmidtmann* [1]), die Reaktion der Magenschleimhaut mit dem Mikromanipulator von *Péterfi* untersucht und immer gefunden (ohne Kenntnis meiner in der Literatur ignorierten älteren Beobachtungen), daß die Belegzellen *die alkalischsten Zellen der Magenschleimhaut sind* (p_H = 6,9 bis 7,1). Auf eine schlagendere Weise hätte die jetzt noch allgemein geltende Lehre, daß die Belegzellen die Orte der Salzsäureproduktion sind, nicht widerlegt werden können.

Selbst wohlwollende Beurteiler der hier vertretenen Richtung haben den Eindruck, daß die elektromikroskopische Methodik mit einem ganzen Turm von neuen und unbewiesenen Hypothesen arbeitet. Es mag sein, daß auf Grund der zahlreichen neuen experimentellen Resultate von Zellpotentialen Vermutungen über aktuelle physiologische Probleme gegeben werden, die richtig oder falsch sein können — wahrscheinlich nicht ganz richtig, aber keineswegs ganz falsch —, auf die aber im allgemeinen kein besonderer Wert gelegt wird. Wer sich in das Problem ein wenig vertieft, wird leicht erkennen, daß die Grundlehre mit diesen Gelegenheitshypothesen nicht so verknüpft ist, daß sie mit ihnen steht oder fällt. Der Hauptwert der neuen Methodik scheint darin zu liegen, daß sie uns dem natürlichen Geschehen dadurch näher bringt, daß sie bei aller Anerkennung des chemischen Fundaments der analytischen Zellforschung doch auch dem überall im Lebenden stark wirksamen elektrischen Faktor zu seiner Geltung oder doch Mitgeltung und Mitberechnung verhilft.

Vielen Biochemikern scheint schon der Gedanke an elektrische Zellpotentiale hypothetisch oder geradezu phantastisch. Die Elektrophysiologen haben ausnahmslos in *allen* Zellen der lebenden Tiere und Pflanzen elektrische Potentiale aufgefunden (elektrische *Ströme*, wie sie die Elektrophysiologen — in diesem Punkte weitgehender als ich — nennen). Allerdings wurden die Potentialdifferenzen der Pflanzenwurzel, -blätter, -gefäße, der tierischen Kreislaufelemente, mit Ausnahme des Herzens, der Leber, Milz, Niere, des Darmes, vernachlässigt zugunsten der Nerven- und Muskelströme, des Hauptarbeitsgebiets der Elektrophysiologie. Das kam einfach davon, daß nur diese beiden Zellarten (in einer einzigen Dimension, der Länge) ausnahmsweise Maße aufweisen, die mit den menschlichen Gliedern untersucht, mit menschlichen Augen gesehen werden können. Es ist einseitigster Anthropomorphismus, der die heutige Lage der Elektrophysiologie geschaffen hat. Oder hat im Ernst ein Physiologe daran gezweifelt, daß in mit groben Händen *nicht* greifbaren mikroskopischen Zellen und Zellteilen, die die überwältigende Mehrheit der Zellen ausmachen, andere elektrische Grundgesetze gelten als in den faserförmigen, dem freien menschlichen Auge erreichbaren Ausnahmszellen, den Muskeln und Nerven? Die Tatsache, daß z. B. die Magendrüsen während ihrer Sekretionstätigkeit charakteristische elektrische Ströme beobachten lassen, ist seit Jahrzehnten

[1]) *Schmidtmann*, Zeitschr. f. ges. exper. Med. **45**, 724, 1925.

bekannt. *Bohlen*, ein Schüler *Biedermanns*, hat dies auf Umwegen dadurch festgestellt, daß er eine Elektrode an die innere Schleimhautfläche des Magens anlegte, eine andere an die äußere Oberfläche, die Serosa des Magens und auf diese Weise regelmäßige elektrische Ströme während der Sekretionstätigkeit ableiten konnte. Es war bei diesen Versuchen klar, daß zwischen der durch zwei Muskelhäute und eine isolierende Oberflächenschicht elektrisch abgedichteten Außenhaut des Magens und seiner inneren sezernierenden und resorbierenden Schleimhaut keinerlei physiologische, keinerlei chemische und keinerlei elektrische Beziehung bestehen konnte, man hatte aber infolge der mikroskopischen Kleinheit der Sekretionszellen im vergangenen Jahrhundert kein Mittel, um diese Potentialdifferenzen direkt im Vergleich mit Zellgattungen zu beobachten, aus denen die Sekretionszellen ihre Stoffe oder ihre Energieleistungen vermutlich bezogen. Die damalige Physiologie hatte die nur auf Umwegen angreifbare Aufgabe vor sich, gleichsam mit Elefantentatzen ein Spinngewebe zu analysieren. Keiner der Elektrophysiologen der vergangenen Jahrzehnte, der eine Zeitlang experimentell gearbeitet hatte, zweifelte aber an der Grundvorstellung, daß alle physiologisch gleichwertigen Punkte eines lebenden Gewebes, beispielsweise alle Punkte eines um einen parallelfaserigen Muskel gelegten Oberflächenmeridians, das gleiche elektrische Potential haben, und daß zwischen ihnen und beliebigen anderen Punkten des Muskels oder beliebiger anderer Organe gesetzmäßige, nicht unbeträchtliche elektrische Spannungen existieren. Die Grundanschauung, daß physiologisch ungleichwertige Punkte jeder lebenden Zelle elektrische Spannungen gegeneinander aufweisen, kann man also nicht als eine neue Hypothese bezeichnen, sie ist ein gesichertes Grundaxiom. Zum Überfluß besitzen wir jetzt in den elektrohistologischen chemischen Methoden und in dem Mikromanipulator *Péterfis* experimentelle Möglichkeiten, diese Potentiale auch in lebenden Einzelzellen zu messen. Soweit solche Messungen, die sehr schwierig auszuführen sind, bisher vorliegen, haben die *Mikromanipulatormessungen durchweg die elektrochemischen Resultate bestätigt* und ebenso das Axiom, daß alle Teile lebender Zellen gegenüber der Erde oder gegenüber einer Normalelektrode Ladungen aufweisen.

Über die Tatsache, daß in den Zellen und zwischen den verschiedenen Zellen elektrische Potentiale gesetzmäßig auftreten, ist wohl auch der skeptischste Beurteiler der mikroelektrischen Methodik kaum im Zweifel. Der Einwand, der in dem mit dieser Methodik nicht Vertrauten aufsteigt, ist immer der: Sind diese Ströme oder Ladungen auch *stark genug*, um die großen Leistungen der elektrischen Zersetzung, der elektrolytischen Synthese und der Kataphorese von Kolloiden zu rechtfertigen, die unsere neue Methodik ihnen zuschreibt? Man müßte immer wieder oft Gesagtes wiederholen, wenn man diesen Einwand widerlegen wollte. Die elektrischen Potentiale der Zelle sind ungemein hoch, relativ höher als die Spannungen, mit denen die Laboratoriumschemie gewöhnlich arbeitet. Um für die elektrische Wanderung von Farbstoffen Bedingungen zu gewinnen, die den biologischen wenigstens annähernd ähnlich sind, mußten meine Mitarbeiter ein physikalisches Institut aufsuchen und mit Spannungen bis zu 800 Volt arbeiten, die sich in physiologischen Arbeitsstätten nicht leicht beschaffen lassen.

Es sei also daran erinnert, daß man in lebenden Geweben häufig Indikatorfärbungen in einer Entfernung von wenigen Tausendstel Millimetern antrifft, die in der geläufigen Bezeichnungsweise um zwei Einheiten p_H (also im elektrischen Maße um 110 Millivolt) auseinander sind. Wenn es nicht primäre elektrische Potentiale sind, die diese Indikatorumfärbungen vor unseren Augen hervorbringen, so wissen wir doch aus der *Nernst*schen Formel der Ionenkonzentration, daß diese Säure-Alkaliketten zumindest sekundär solche Potentiale — wenn auch in entgegengesetzter Richtung — erzeugen müssen. Ein Spannungsgefälle von 110 Millivolt auf 10 Mikron entspricht aber für die uns gewohnten Verhältnisse des freien Auges *einer Spannung von 1100 Volt für 10 cm,* also einer lebensgefährlichen elektromotoıischen Kraft, wenn nicht die biologische Stromstärke im allgemeinen ungemein niedrig wäre. Überdies wirken nach dem *Coulomb*schen Gesetz (1789) der quadratischen Steigerung auch dieselbe Voltspannung in der Entfernung von 10 Mikron in *geometrischer* Progression stärker als in der Entfernung von 10 cm.

Nach den Indikatorumschlägen in Zellen berechne ich die Spannung der lebenden Zelle in dem üblichen Maße nach dem *Coulomb*schen Quadratgesetz auf einige Millionen Volt pro Zentimeter. *Reinhold Fürth* berechnet nach den experimentell meßbaren Kolloidladungen von 50 Millivolt für das gewöhnliche übliche Maß von Volt pro *Zenti*meter eine *Größenordnung von 500,000 Volt.* Ich akzeptiere gern die Korrektur von *Fürth,* weil auch diese kleineıe, aber unbedingt gesicherte Ziffer einen Begriff gibt von der Intensität der elektromotorischen Kraft, die die gewöhnlichen gelösten Biokolloide auf sich tragen.

Ist es eine Hypothese, daß man in der Elektrophysiologie die elektrostatischen Erscheinungen von den elektrogalvanischen scharf unterscheiden muß? Das hat *Du Bois Reymond* schon 1848 verlangt und auch in seinem grundlegenden Werke über „Tierische Elektrizität" genau durchgeführt. Für die sich aufdrängenden Annahmen der elektrolytischen Oxydation, der elektrosynthetischen Reduktion, die die jahrelange Untersuchung der Zellelektrizität gleichsam von selber erzeugt, wäre es viel einfacher, die beobachteten elektrischen Erscheinungen einfach als Ströme, nicht als statische Ladungen zu deuten, denn Ströme, die unter sonst gleichen Umständen chemisch unvergleichlich wirksamer sind, können alle biochemischen Assimilations- und Dissimilationsreaktionen bequem „erklären". Wenn gleichwohl jede beobachtete Potentialdifferenz zunächst nur als statische Ladung gedeutet wird, nicht als Strom, wie ihn die meisten Elektrophysiologen bezeichnen, so ist dies keineswegs eine neue Annahme, sondern eine Einschränkung der landläufigen Hypothese, die dadurch nicht weniger Hypothese ist, daß man sich ihrer gewöhnlich nicht bewußt ist.

Die Mikroelektrik ist nicht eine Angelegenheit für irgend einen oder ein paar Spezialuntersucher, sie ist ein Versuch, der auf die Grundlagen der gegenwärtigen physiologisch-chemischen Methodik hinzielt. Wer sich damit befaßt, erkennt bald, daß sie nicht eine Spezialität einiger Weniger bleiben kann, sondern daß auch jeder Analytiker, jeder Konstitutionschemiker, jeder physikalische Physiologe zumindest die Anfangsgründe der Mikro-Physiko-Chemie beherrschen muß, um seine Gedanken über die Engrosbiochemie der Gesamtorgane an der Einzelarbeit der Zelle kontrollieren zu können. Wenn jeder Biochemiker sich zunächst gedanklich, später hoffentlich auch experimentell auf eine Zellularbiophysik einzustellen versuchte, so wird er bald finden, daß die neue Methodik keineswegs aus Hypothesen besteht, sondern daß ihr Hauptresultat — bisher wenigstens — ein negatives ist, indem sie mit überalteten Hypothesen bricht.

Was in diesen Betrachtungen fremdartig oder allzu hypothetisch anmuten mag, wird in ein paar Jahren eine Banalität sein. Die praktische Bedeutung der neuen Betrachtungsweise hat sich inzwischen an einer Reihe zoologischer und morphologischer Probleme in eklatanter Weise bewährt. Es sei zunächst an die zuerst in dieser Zeitschrift[1]) erschienene Arbeit gemeinschaftlich mit *Gicklhorn* erinnert, in der gezeigt wurde, daß sämtliche Organe eines Tieres sich elektiv mit entsprechend im Dispersitätsgrad und Ladungssinn abgestuften Farbstoffen ausfärben lassen, schließlich auch einzelne Teile eines Organs, z. B. vier Abschnitte der Exkretionsorgane, einzelne gesonderte Neurone des Zentralnervensystems. Seither sind eine ganze Reihe anderer Resultate zu verzeichnen. In dieser Arbeit war noch ein Organ photographiert gezeigt, das in allen Lehrbüchern als *Haftorgan* bezeichnete Drüsenorgan des Nackens der Daphnie[2]). Es hat sich mit voller Sicherheit nachweisen lassen, daß die Bezeichnung Haftorgan eine durch nichts begründete Hypothese ist, daß das Organ das Atmungsorgan der jugendlichen Daphnie ist, und daß es genau dieselben Reduktions- und Oxydationszellen enthält wie die Kiemen der erwachsenen Daphnie. Kurz darauf hat *Gicklhorn* mit dem identischen Verfahren der Reduktions- und Oxydationsorte das bisher nicht bekannte *Atmungsorgan von Cyclops gefunden.* Cyclops ist wohl einer der häufigsten und genauest untersuchten Copepoden unserer mitteleuropäischen Teiche und Tümpel, von dem man nie ein Atmungsorgan gesehen hat. In den Handbüchern steht, daß Cyclops durch Hin- und Herbewegen des Darmes atmet. Der Darm befindet sich inmitten von reduzierenden Säften im Innern der Leibeshöhle. Die Hypothese ist offenbar dadurch entstanden, daß dieses Tier, das kein Herz besitzt, die Säftemischung durch Darmbewegungen besorgt, die unter dem Mikroskop sehr auffallen, da der durch Detritus dunkle Darm in dem wasserhellen Tiere sich scharf abhebt. Der Irrtum wurde durch die physikalisch-chemische Mikroskopie dadurch beseitigt, daß mit den gewöhnlichen positiven und negativen Methoden die beiden Kontrastbilder, das der Reduktions- und das der Oxydationsorte, erschienen, die mit den Kiemen der Cladoceren genau übereinstimmen. Ein anderes Organ einer verwandten Art, der sogenannte *Kopfschild von Polyphemus,* erwies sich ebenfalls als typisches Atmungsorgan, während ein als Haftorgan bezeichnetes Nackenorgan von *Sida* und *Simocephalus* tatsächlich sich als Haftorgan mit Haftmuskeln deklarierte und sich dementsprechend organspezifisch färbte.

---

[1]) Diese Zeitschr. 158, 2, 1924.

[2]) Siehe die folgende Arbeit.

Wenn also eine kaum einjährige Arbeit in der Zoologie und in morphologischen Fragen so viel herausgebracht hat, während zugleich rund 200 Farbstoffe systematisch auf ihren physikalisch-chemischen Charakter untersucht wurden, um wieviel mehr hat die Biochemie von einer Methodik zu erwarten, die doch, wenn es auch auf den ersten Blick nicht so scheinen mag, im Wesen eine *chemische* Methodik ist. Sie verzichtet allerdings nicht auf die Berücksichtigung des elektrischen Faktors, ja, sie stellt es als Hauptgrundsatz auf, daß man *Chemie des lebenden Zellorganismus mit Ausschluß des allgegenwärtigen elektrochemischen Faktors überhaupt nicht betreiben kann.*

Die Gegner der hier vertretenen Anschauungen, die hier und da ein Wort äußern, an das man eine Erwiderung knüpfen kann, werden Resultaten tatsächlicher Natur nichts Wesentliches entgegensetzen können, viel stärker werden neue Entwicklungen behindert durch ein gewisses geistiges Beharrungsvermögen, das den Mitteilungen über experimentelle Resultate eine uninteressierte Objektivität entgegensetzt und darauf wartet, durch besonders schlagende Resultate aus seiner Ruhe aufgeschreckt zu werden. Keiner der offenen Gegner, keiner der skeptischen Parteilosen hat es bisher der Mühe wert gefunden, auch nur den einfachsten Grundversuch nachzuprüfen, die Kontrastfärbung eines Pflanzenzweigquerschnittes mit entgegengesetzt geladenen, aber sonst identischen Sulfosäurefarbstoffen, geschweige denn, daß jemand die Dielektrizitätskonstanten biochemischer Materialien nachbestimmt oder neubestimmt hätte. In den biochemischen Arbeiten der letzten Zeit, die zum Teil bei Berücksichtigung der hier erörterten Gesichtspunkte viel Arbeit erspart hätten, wie sich leicht an Einzelbeispielen zeigen ließe, hat diese Methode der Zellphysik kaum einen Niederschlag hinterlassen.

In den nachfolgenden Mitteilungen sind einige Ergebnisse tatsächlicher Natur zusammengefaßt, ergänzt durch die Möglichkeiten, die sich aus der weiteren Verfolgung der hier erörterten Gesichtspunkte ergeben.

Zusammenfassend sei hervorgehoben, daß die neue Methodik der Elektrizitätsladung, dem Dispersitätsgrad (Teilchengröße) der natürlichen Zellteile und künstlicher Beimengungen nachgeht, sie teils als Reagenzien für Zellchemismus und Zelladungen benutzt, teils sie mit dem Mechanismus biochemischer, nicht enzymatischer Stoffoxydationen und -reduktionen in Zusammenhang zu bringen sucht.

Sowohl die Berechnung als das Experiment zeigen, daß wir in lebenden Zellen relativen *Hochspannungen* begegnen.

Kataphorese von Stoffen unter physiologischen Bedingungen.

Nach Versuchen von R. Fürth und J. Gicklhorn im Institut für theoretische Physik an der deutschen Universität in Prag.

Von

R. Keller (Prag).

(Eingegangen am 23. November 1925.)

Seit langer Zeit hatte der eine von uns (*Keller*) den Wunsch, ein Verfahren zu besitzen, das den Wanderungssinn gefärbter und ungefärbter Stoffe im elektrischen Strome in ganz einwandfreier und leicht reproduzierbarer Weise zu demonstrieren erlaubt. Diese Konstatierung ist von grundlegender Bedeutung für die gesamte Zellphysik, wie in dem vorausgehenden ersten Aufsatz neuerlich erläutert wird.

Was waren die Hauptfehler der bisherigen Kataphoreseapparate? Zunächst die vergleichsweise niedrige Spannung in der Flüssigkeit. Während man im Gewebe der Organismen auch nach der bisher herrschenden Auffassung elektromotorischen Kräften begegnet, die auf den Tausendstel Millimeter zumindest Hundertsteln von Volts entsprechen, also für sichtbare Entfernungen von einigen Zentimetern Hunderten von Volt, verwendeten die bisherigen Untersucher durchweg viel kleinere Spannungen (bis auf jene, die unter dem Ultramikroskop beobachteten). Infolgedessen konnte man die Bewegung niemals direkt sehen, sondern mußte sie nach halben Stunden indirekt aus Veränderungen erschließen. Ferner verwendeten alle Experimentatoren metallische Zuleitungselektroden, etwas, was es in der Organismenwelt nirgendwo gibt. Diese Metallelektroden erzeugen eine unphysiologisch hohe Stromstärke (zwei und mehr Größenordnungen höher als die physiologische), sie bewirken eine starke Elektrolyse mit unphysiologisch starker Säure- bzw. Alkaliproduktion an den beiden Polen, an der die neutralen Kolloide gewöhnlich umgeladen werden, so daß, begünstigt durch die lange Versuchsdauer, typische Fehler und Umladungen entstanden, die ganze Gruppen von Untersuchern zu denselben Fehlresultaten führten. Schließlich benötigt man für den physikalischen

Modellversuch einen hohen Spannungsabfall *innerhalb* eines flüssigen oder halbflüssigen Substrats oder in der Substanz eines nichtmetallischen Halbleiters, wenn er sich den Verhältnissen der lebenden Zelle annähern soll.

Wir haben die verschiedensten Materialien als Elektroden versucht, darunter auch Halbleiter organischen Ursprungs: Holz, Filtrierpapier und verschiedene künstliche Stoffe. Schließlich verfiel man auf einen porösen Kunststein, der zufällig zur Hand war, nämlich die Bausteine aus *Richters* Ankersteinbaukasten, dem bekannten Kinderspielzeug. Mit diesem Material gelang es, das Verhalten der Farbstoffe im physiologischen Milieu glatt und sicher zu reproduzieren. Die Sulfosäurefarbstoffe wanderten in Alkali zur Anode, in Säure zur Kathode, Methylenblau in Wasser wanderte rein zur Kathode, in Alkali überwiegend zur Kathode, in Serum rein zur Anode wie im lebenden Tiere. Wir verwandten Spannungen bis zu 800 Volt und konnten die Farben sofort unter dem freien Auge zur Wanderung bringen.

Wir haben auf Grund der von *Fürth* herrührenden Apparatur weiter gearbeitet. Da wir rund 200 Stoffe in verschiedenen neutralen, sauren und alkalischen Medien wandern ließen, ersetzten wir die großen Ankerbausteine, die viel Material und Durchströmungsflüssigkeit erforderten, durch kleine poröse Schamottestifte, die sich gut anfärben ließen, in gewissen Fällen verwendeten wir mit Vorteil angefeuchtetes Filtrierpapier als Elektrode. Mit dieser Anordnung haben wir unter abgestuften Spannungen und Konzentrationen im Zeitraum von 2 Monaten annähernd 1000 Wanderungsversuche gemacht, die an anderer Stelle beschrieben werden, und die zum größten Teil noch unveröffentlicht sind[1]). In den meisten Fällen wurden Elektroden aus Schamotte verwendet, für die *Bethe* und *Thoropoff* Vorversuche geliefert haben.

Die wesentlichsten Resultate lassen sich in ihrer physiologischen Bedeutung etwa folgendermaßen charakterisieren:

Der *chemische* Charakter der Farbstoffe tritt in diesen Versuchen viel stärker hervor, als es nach den älteren Versuchen von *Keller* geschienen hat, da diese älteren Versuche mit ziemlich unreinen Farbstoffen und nicht so reinem Wasser ausgeführt wurden. Die reinen basischen Farbstoffe sind in ganz reinem Wasser richtige Basen, die Säurefarbstoffe in Wasser reine Säuren, während sie nach den älteren Wanderungsversuchen überwiegend als umladbare Neutralkolloide erschienen sind. *Keller* hatte nach seinen ersten Versuchen die Vorstellung gewonnen, daß beispielsweise *Methylenblau* die Verbindung einer ganz schwachen Base mit einer starken Säure (Chlorwasserstoff) ist, daß sie beim Auflösen im Wasser hydrolysiert wird, und daß in der nunmehr sauren Lösung das neutrale Kolloid durch

[1]) Die Apparatur nach dem Stande vom Juli 1925 ist von *Fürth* beschrieben in der Kolloid-Zeitschr. 37, 200, 1925.

den Elektrolyten grobdispers wird und, da bei groben Partikelchen der chemische Charakter gegenüber der Oberflächenladung zurücktritt, das neutrale Farbkolloid anodischen Wanderungssinn (nach *Coehns* Regel der Dielektrizitätskonstante) erhält. Beim sauren Kongorot schien der Vorgang umgekehrt. (Im biologischen Testobjekt erscheint Methylenblau rein an den Anoden, Kongorot rein an den Kathoden.)

Der wirkliche Sachverhalt ist anders und nähert sich mehr den klassischen Vorstellungen von der Natur der Farbstoffe.

Nehmen wir gleich das von den Physiologen viel benutzte *Methylenblau*. Ganz reines Methylenblau (medicinale, *Grübler*), aufgelöst in zweimal im Platintiegel destilliertem, ganz reinem Wasser, wandert allein zur Kathode; in Leitungswasser, das einen ganz minimalen Elektrolytgehalt hat, zweigt schon eine schwache Färbung auch zur Anode ab, der weitaus größte Teil geht aber weiter zur Kathode. In Ringerlösung ist die anodische Teilwanderung etwas stärker, bleibt aber immer noch sehr deutlich gegenüber der kathodischen zurück. In Serum, das nicht ganz frisch erhalten werden konnte und dem wegen der Ansäuerung nach dem Tode ein minimaler Alkalizusatz gegeben werden mußte, wanderte es dagegen *rein zur Anode*. Damit ist die Übereinstimmung mit dem lebenden Testobjekt wohl hergestellt, aber in einer anderen als der erwarteten Weise.

Physiologisch erscheint dieses Resultat von grundlegender Bedeutung. Es läßt nämlich erkennen, daß das Methylenblau nicht aus eigenem Antrieb zur Anode wandert, sondern daß es von einem farblosen biochemischen Kolloid offenbar mitgenommen und auf diesem, zunächst unsichtbaren Vehikel, das allem Anschein nach ein feindisperses Körperkolloid ist, zur Anode geschleppt wird. *Den Wanderungen der Farbstoffe liegen* also, wie es schon *Ehrlich* vorgeschwebt hat, normale *biologische Stoffwanderungen farbloser Körper* zugrunde.

Es sei gleich hinzugefügt, daß dieses Neutralkolloid nicht einfach *Eiweiß* ist, das am nächsten liegt, da es sich so leicht durch kleine Alkali- oder Säuremengen auf negativen bzw. positiven Wanderungssinn bringen läßt. Wir haben schon früher Methylenblau in Eiweißlösungen wandern lassen, wobei es sich herausgestellt hat, daß es auch in alkalisierter Eiweißlösung keineswegs rein oder auch nur überwiegend zur Anode wandert. Jetzt haben wir nun das reine Methylenblau in dem unverdünnten, aber filtrierten Weiß des Hühnereiweiß wandern lassen und dabei festgestellt, daß es darin *rein zur Kathode wandert*, was uns nach unseren zahllosen Beobachtungen über die anodische Wanderung dieses Farbstoffs in lebenden Zellen sehr überrascht hat. Es ist also aller Wahrscheinlichkeit noch ein anderer im Serum und im Protoplasma anwesender Stoff von Neutralkolloidcharakter, der zu den Zellanoden transportiert wird und das adsorbierte Methylenblau mitführt.

Eine rätselhafte, bisher nicht aufgeklärte Erscheinung bei diesen Versuchen ist der starke Einfluß der *Spannung* auf die Kataphorese. Wenn man diese zwischen 50 bis 800 Volt variiert, was in der *Fürth*schen Anordnung leicht möglich ist, so treten verschiedene Veränderungen an den Farbstoffen auf, die sich namentlich an den Farbstoffen mit Indikatorcharakter gut verfolgen lassen. Läßt man die Stromstärke nahezu Null werden, um die Zellelektrizität möglichst genau nachzuahmen, so werden nicht nur die Indikatoren an den Anoden nicht säurefarben, an den Kathoden

nicht basenfarben, was der Beweis dafür ist, daß auch minimale Elektrolysen sich vermeiden ließen, sondern man erhält bei einer ganzen Reihe von Indikatoren paradoxe Resultate, einen Umschlag zur Säurefarbe oder zu mehreren Übergangs*säure*farben an der Schamotte*kathode*, also an der verkehrten Stelle! Diese Versuche wurden sehr oft wiederholt und nachkontrolliert, immer mit demselben Resultat.

Bei den biologischen Anoden und Kathoden haben wir ähnliche Anomalien niemals beobachtet. Bei diesen kommt es vor, daß die erwartete Umfärbung des Indikators ausbleibt, weil die Spannung nicht ausreicht oder aus anderen unbekannten Gründen. Niemals aber haben wir einen Farbumschlag nach der entgegengesetzten Richtung beobachtet.

Zusammenfassend sei bemerkt, daß gefärbte und ungefärbte Verbindungen, wenn sie unter den Verhältnissen der lebenden Zellen, also unter vergleichsweise hoher Spannung und minimaler Stromstärke zur Wanderung im elektrischen Strome gebracht werden, sich der Wanderungssinn in wenigen Sekunden genau feststellen läßt, und daß die *Wanderung der auf diese Weise untersuchten Farbstoffe gut mit ihrem* Verhalten in den pflanzlichen und tierischen *elektrohistologischen Testobjekten übereinstimmt.* Dies gilt für sämtliche bisher untersuchte Farbstoffe mit Ausnahme von Kongorot, Kongorubin, die noch genauer nachuntersucht werden sollen.

Kataphorese von Sauerstoff und Kohlensäure. Positiver Sauerstoff?

Von

R. Keller und **J. Gicklhorn** (Prag).

(Aus dem Institut für theoretische Physik an der Deutschen Universität, Prag.)

(Eingegangen am 23. November 1925.)

Das Kapitel Atmung ist eines der merkwürdigsten vom Standpunkt der physikalisch-chemischen Mikromethodik. In morphologischer Beziehung hat es, wie bereits erwähnt, sehr bald zu einer Reihe von wichtigen und unbestrittenen Erfolgen geführt, namentlich bei solchen niederen Krustern, bei denen Unsicherheiten über die Atmungsorgane bestanden. Man findet sie am leichtesten auf durch die Behandlung mit kathodisch wandernden Reagenzien auf Reduktionsorte, Rutheniumrot, Silbernitrat, Eisensalzen, ferner mittels Indikatoren auf mittelstarke Basizität. Wohl enthalten alle Atmungszellen, wie überhaupt alle tierischen und pflanzlichen Zellen auch Sauerstofforte und Anoden, aber doch weniger als andere Zellen, während der Physiologe geneigt ist, in den Atmungsorganen zunächst nach Sauerstofforten zu suchen. Auch die Atmungskapillaren der Würmer erweisen sich als überraschend stark kathodisch.

Die Atmung der Niederen ist noch schwerer zu verstehen, wenn man unsere physiologischen Laboratoriumstiere, die Daphnien und Cyclopse, bei der Atmung beobachtet. Diese anspruchslosen, aber sehr sauerstoffgierigen Tiere leben bei der Zimmertemperatur von 20° C, bei der das Wasser $^1/_{30}$ Proz. Sauerstoff enthält, wochenlang in der Tiefe von Bechergläsern bei einer Sauerstoffkonzentration von Bruchteilen eines Promilles. Was für eine Kraft muß es sein, die diese minimalen Sauerstoffmengen auf die kleinen Kiemenzellen der Crustaceen hinzieht, hinzwingt. Im Grunde besteht dasselbe Problem auch für die Lungenatmung der höheren Tiere. Man hat Bände darüber geschrieben, ob die Sauerstoffkonzentration in der Lunge größer ist als im Blute, ob also der Sauerstoff einfach nach den Orten niederer Konzentration ins Lungenblut hineindiffundiert. Überwiegend hat man

gefunden, daß eine aktive Zellkraft den Sauerstoff in die Lungenkapillaren hineintreibt, da in gewissen Fällen eine höhere Sauerstoffkonzentration im Blute feststeht. Das Resultat dürfte zutreffend sein, die Fragestellung jedoch scheint uns nicht ganz richtig. Nicht das Blut nimmt den Sauerstoff auf, sondern nur ein ganz kleiner Bruchteil der Blutmasse, nämlich das Hämoglobin des Blutkörperchens, das man spektroskopisch und auf anderen Wegen als den Sauerstoffdepotort des Blutes längst sichergestellt hat. Auf diesem Hämoglobin herrscht auf alle Fälle ein Mehrfaches der Sauerstoffkonzentration der Lungenalveolarluft, es wandert also *der Sauerstoff entgegengesetzt seinem Konzentrationsgefälle*, er wandert *elektiv*, wie man sagen würde, wenn er ohne Spektroskop mit der menschlichen Netzhaut sichtbar wäre, nach gewissen Teilen der Blutelemente, getrieben von einer unbekannten Kraft. Man mußte sich sagen, diesmal konnte es keine elektrische Kraft sein, denn der bekanntlich negative Sauerstoff wandert elektiv zu den roten Blutkörperchen, deren starke Negativität eine der wenigen mikroelektrischen Tatsachen ist, die nicht bezweifelt werden. Von diesen kleinen Kathoden müßte der Sauerstoff energisch abgestoßen werden.

Bei den zahlreichen Wanderungsversuchen im elektrischen Strome ist es dem einen von uns (*Keller*) längst aufgefallen und ist als paradoxe Erscheinung schon früher hervorgehoben worden[1]), daß reduziertes farbloses Methylenblau, das man an der Luft elektrisch durchströmt — wenn es nicht angesäuert ist, sondern eher eine Spur alkalisch —, merkwürdigerweise sich *an der Kathode bläut*, nicht an der Anode, wo jeder Elektrochemiker die Sauerstoffausscheidung erwartet, und wo auch tatsächlich bei genügender Stromstärke und Spannung freier Sauerstoff als Produkt der Elektrolyse erscheint. Manchmal stieg bei diesem unzähligemal wiederholten Grundversuch schon der Verdacht auf, ob nicht vielleicht der Luftsauerstoff zur Kathode wandern könnte, dieser Gedanke wurde jedoch als unmöglich nicht weiter verfolgt. „Sauerstofforte" erschienen gleichbedeutend mit Anoden. Die Lösung kam auf eine überraschende Weise durch die neuesten Versuche von *E. Wertheimer*[2]) in *Abderhaldens* Laboratorium.

Wertheimer verfolgt seit einigen Jahren die Frage der einseitigen, gerichteten Permeabilität gewisser Membranen zunächst an der Froschhaut. Seine Resultate sind für den Mikroelektrochemiker von ganz besonderem Interesse, eben deshalb, weil er den hier vertretenen Methoden vollkommen fernsteht.

[1]) Neue Versuche über mikroskopisch-elektrischen Nachweis. Von *R. Keller*, S. 55—56. Wien, Braumüller, 1919.
[2]) Pflügers Arch. **209**, 493, 1925; frühere Literatur daselbst.

Bei *Wertheimer* bewegen sich nämlich alle Farbstoffe, alle Biokolloide, alle Zucker, Säuren, Basen, Salze usw. genau so wie in unseren Testobjekten und in unseren Kataphoreseversuchen, und zwar so, als ob die Richtung von innen nach außen durch die Froschhaut die anodische wäre, die umgekehrte die kathodische. *Wertheimer* hat auch Methylenblau und Säurefuchsin durch Säure und Base umgeladen, wobei sie den Wanderungssinn umkehrten, genau so wie in unseren analogen Versuchen an pflanzlichen Querschnitten. Neuestens hat *Wertheimer* nun auch Gase durch seine Froschhaut wandern lassen, wobei Kohlensäure nach außen wanderte, also zur Anode, wie man es von unserer Theorie aus erwarten mußte, und Ammoniak zur Kathode, ebenfalls wie erwartet. Aber Sauerstoff wanderte nach innen, also zur Kathode, zumindest naszierender Sauerstoff aus Wasserstoffsuperoxyd! *Wertheimer* hat auch die Lungenmembran des Frosches, ferner die Schwimmblase der Fische untersucht und immer eine gerichtete Permeabilität gefunden, und zwar in der Lunge in der Richtung der Sauerstoffaufnahme bzw. Kohlensäureabgabe.

Nach den Ergebnissen der *Wertheimer*schen Untersuchung war es klar, daß man endlich Sauerstoff im elektrischen Strome wandern lassen mußte, wozu uns die *Fürth*sche Hochspannungskataphorese Gelegenheit gab, zumal gelegentlich beobachtet worden war, daß Joddampf sich elektiv an der Anode niederschlug, was ja nicht überraschend ist. Tatsächlich zeigte es sich gleich beim ersten Versuch evident, daß der *Sauerstoff* elektiv oder in einigen Fällen stark überwiegend an der *Kathode* erschien.

Der Versuch wurde oft und oft wiederholt, immer mit demselben Resultat. Es wurden Schamotteelektroden verwendet, ferner Elektroden aus feucht gehaltenem Filtrierpapier, Elektroden aus Indophenolpapier, Elektroden, die mit reduziertem farblosen Methylenblau oder mit reduziertem Indigo getränkt waren und an denen der Sauerstoff in Form einer starken Bläuung unmittelbar über der Wasserfläche erschien. Wenn der Strom ohne Wasser nur in Luft durch das feuchte Filtrierpapier zwischen nahen Elektroden faktisch auf Null herabging, so wurde das ganze Kathodenpapier blau. Versuche, gasförmigen freien Sauerstoff mit Hilfe eines glühenden Spans in der Umgebung der Kathode festzustellen, blieben vorläufig negativ.

Die Tatsache, daß es eine positive Abart des Sauerstoffs gibt, oder eine leicht sauerstoffabgebende Verbindung, die zur Kathode wandert, z. B. Wasserstoffsuperoxyd, die so wandert wie das basische Gas Ammoniak (das wir ebenfalls genau untersuchten) und entgegengesetzt wie Kohlensäure, war nicht länger zu bezweifeln. Die Bedeutung dieser Tatsache für den Stoffwechsel der Tiere und Pflanzen kann kaum überschätzt werden. Nach unserer Feststellung ist das Gewebe aller Tiere und Pflanzen durchsetzt von positiven bzw. in der entgegengesetzten Richtung negativen Potentialgefällen, die den Transport der Flüssigkeiten, Kolloide, Suspensionen dort übernehmen, wo mechanische Kräfte, Diffusion, Osmose, Gravitation, nicht in Betracht kommen. Nun zeigt es sich, daß *auch Gase nach charakteristischen Gesetzen im*

elektrischen Felde positiv oder negativ *wandern*, die Kohlensäure entgegengesetzt wie Sauerstoff, was mit einem Schlage eine große Zahl der heterogensten Vorgänge im Stoff- und Energiewechsel pflanzlicher und tierischer Organismen aufhellt.

Soweit die Wanderungsrichtungen dieser natürlichen Gase im pflanzlichen und tierischen Gewebe bekannt sind, können wir sie nunmehr als Kontrolle der Teerfarben, der Indikatoren, der Mikromanipulatormessung benutzen, und es lassen sich vielleicht aus ihnen die elektrohistologischen Potentialgefälle in solchen Fällen erschließen, in denen andere Methoden versagen.

Die paradoxe Wanderungsrichtung des atomaren Sauerstoffs (oder der leicht sauerstoffabgebenden Verbindung) ist von einer sehr großen allgemeinen Bedeutung für die gesamte Zellphysiologie, besonders vom Standpunkt der üblichen Anschauungen über die ausschließliche Stromnatur der Bioelektrizität. Es liegt auf der Hand, daß ein *elektrischer Strom*, direkt oder indirekt aus Verbrennungsenergien von Kohlehydraten oder Fettsäuren gewonnen, nur dann einen Energieüberschuß von Wärme, Elektrizität oder mechanischer Energie dem Organismus liefern kann, wenn seine Kathode depolarisiert ist, d. h. wenn sich an seinem Kohlepol Braunstein oder eine andere sauerstoffabgebende Substanz befindet, so wie beim Leclanché-Element. Sonst wird das am Zinkpol durch Oxydation von Traubenzucker zu Milchsäure oder Kohlensäure entstehende Energieplus durch die Wasserzersetzung, die Reduktion am negativen Pol nahezu voll aufgezehrt. Wenn man also der Ansicht ist, daß lebende Zellen einen nahezu konstanten Strom liefern, wie beispielsweise die lebende durchblutete Netzhaut auf den Reiz (Anstoß) von außen durch die minimale Auslösungsenergie der Lichtstrahlen, so müssen die negativen Pole fortwährend durch sauerstoffabgebende Substanzen oder durch einen Sauerstoffvorrat depolarisiert werden. Das ist die Grundvoraussetzung jeder elektrochemischen Ausnutzung von Oxydationsenergie und war einer der stärksten Einwände gegen die Auffassung der Zelle als elektrochemisches Primärelement oder als Ionenkonzentrationselement, wie die übliche Terminologie es wohl benennen würde. Durch die festgestellte relative Kathodizität des Sauerstoffs ist diese Hauptschwierigkeit beseitigt.

Von sonstigen bisher untersuchten Gasen wandern Schwefelwasserstoff und Formaldehyd, die beide als schwache Säuren gelten, wie Sauerstoff zur Kathode, zur Anode wandern außer Kohlensäure auch der Dampf von Chlorwasserstoff und Salpetersäure. Schwefelwasserstoff wandert trotz seiner Säurenatur auch bei *Wertheimer* in der Froschhaut von außen nach innen (kathodisch).

Ob es wirklich atomarer Sauerstoff ist oder eine sauerstoffabgebende Verbindung, ist bis jetzt noch nicht vollkommen sichergestellt. Das Resultat ist im höchsten Maße unerwartet. Zwar ist ein Sauerstoff*molekül* in erster Annäherung neutral und nicht negativ, was wir an der positiven Elektrode als Sauerstoff aufsteigen sehen, ist der vorher ionisiert gewesene Sauerstoff des Säurerestes, der an der Anode entladen wird, nachdem er als negatives Ion zur Anode gewandert war und als Molekül von der Elektrode wegen seines leichten Gewichtes sich loszureißen scheint. Aber das in sich neutrale Sauerstoffatom wird immer noch in der elektrischen Spannungsreihe als relativ negativ im Vergleich mit anderen Stoffen betrachtet. Wer den Versuch nicht selbst gesehen hat, wird sehr geneigt sein, ihn für einen Irrtum zu halten.

Ebenso überraschend wie der anorganische Versuch ist die starke Affinität der tierischen Atmungsorgane für Kationen. Photographien kathodischer Färbungen lebender Tiere sind erschienen in dieser Zeitschrift[1]), in der zweiten Auflage meines Buches „Die Elektrizität in der Zelle"[2]), in zoologischen und morphologischen Zeitschriften[3]).

Die rein deskriptive Morphologie hat Bilder von solcher Anschaulichkeit und Reinheit, wie sie die elektrohistologische Methodik mit großer Sicherheit liefert, bisher nicht zustande gebracht. Man kann die Negativität der Hautkapillaren weniger vollständig, aber fast ebenso leicht reproduzierbar auch durch leicht diffusible *Indikator*farbstoffe demonstrieren, z. B. durch Bromkresolpurpur, der die Hautkapillaren basisch (kathodisch) anfärbt.

Der eine von uns (*Keller*) vertrat in dieser Zeitschrift und anderwärts auf Grund von verschiedenen supravitalen Färbungen die Anschauung, daß *alle* Kapillaren, nicht bloß die der Atmungsorgane, Sitze einer starken Negativität sind. Von den roten Blutkörperchen der höheren Tiere ist die Elektronegativität seit langem bekannt und ihre Abstufungen während pathologischer Zustände, ferner während der Schwangerschaft untersucht. Unsere Versuche, diese *allgemeine* Negativität aller Kapillaren auch bei niederen Tieren, ferner bei Fischen und Salamandern zu demonstrieren, waren bisher nicht von Erfolg. Sowohl beim *Tubifex* als bei einem anderen Wurm (Rhynchelmis), als bei Salamanderlarven und Fischen zeigten sowohl Schwermetallkationen als Indikatoren, daß die Atmungskapillaren zumindest deutlich negativer sind als die anderen Kapillaren. Bei der Untersuchung der Hautkapillaren des Schwanzes vom Salamander könnte man sich vorstellen, daß die Eisenkationen nur deshalb dort auch bei starken Lösungen nicht eindringen, weil dieser Körperteil eine positive Außenschicht hat, die die Kationen abhält, aber auch Versuche mit angeschnittenen Tieren ergaben keine deutliche Elektronegativität dieser Gefäße. Beim Rhynchelmis ergab sich, daß das große innere Hauptgefäß, das kontraktil ist und das Herz vertritt, nicht negativer ist als andere Gewebszellen.

Bei *Tracheen*endzellen von Wasserinsekten ließ sich bisher keine besondere Negativität demonstrieren, dagegen traten die positiven Stellen mit Methylenblau stark hervor.

Behandelt man die Kiemensäckchen der Daphnien oder andere Atmungsorgane niederer Wassertiere mit einem *Reduktions*reagens, so wird dieses sofort in großen Mengen auf ihnen niedergeschlagen. Diese Reduktionsreaktion ist sehr stark und erfolgt in einigen Sekunden, während beispielsweise bei dem von uns am genauesten untersuchten Objekt, den Daphnien, die Oxydation an den Oxydationsorten (Netzlücken) eine Zeit von mindestens 10 Minuten erfordert, aber immer schwächer bleibt als die Reduktion an den Reduktionsorten (Netzmaschen). Ordnet man die Stärke der Reduktion nach dem Eindruck unter dem Mikroskop, bei der quantitative Bestimmungen in diesem Falle durch die große Zahl von Tausenden von Beobachtungen ersetzt werden müssen, so ist an den Reduktionsorten am weitaus stärksten die Reduktion, viel schwächer die Elektronegativität, noch schwächer die Basizität. Bei den Anoden vermögen wir zwischen Oxydationsintensität, Positivität und Acidität keinen sicheren

[1]) Diese Zeitschr. **153**, 1924.

[2]) Mährisch Ostrau, Verlag Kittl, 1925.

[3]) Zeitschr. f. Zellforsch. **2**, 522, 1925. Andere Darstellungen befinden sich teils im Druck, teils in Vorbereitung.

Unterschied anzugeben. Die relativ schwächere Elektronegativität gegenüber der starken chemischen Reduktionswirkung kann ihre Ursache darin haben, daß die von früher her dauernd wirkende Negativität elektrolytisch Reduktionsstoffe ansammelt, wie sie sich an jeder organischen Kathode vorfinden.

Obzwar wir tief durchdrungen sind von der durch zahlreiche Versuche gefestigten Überzeugung von dem lebenswichtigen Charakter der biologischen Kathoden für den Ablauf aller biochemischen Prozesse, können wir bisher die Möglichkeit nicht ausschließen, daß bei der Atmung der niederen, im Wasser lebenden Organismen vielleicht ein chemischer Reduktionskörper in der Körperflüssigkeit zu kreisen scheint, irgend ein farbloses, dem Hämoglobin der höheren Tiere vergleichbares sauerstoffbindendes Protein, das rein chemisch im bisherigen Sinne zu wirken hätte.

Bei der Daphnie hat sich durch die systematische Untersuchung mit bestimmten, nach physikalisch-chemischen Gesichtspunkten geordneten Reagenzien und Farblösungen folgendes ergeben: Eine Zahl von Daphnien des Jugendstadiums ließen die spezifischen Vitalfärbungen nicht erzielen. Dagegen ergab sich bei diesen Tieren, daß ein drüsenähnliches Gebilde am Nacken sich färbte, und zwar immer mit der elektiven Vitalfärbung für die Kiemensäckchen. Dieses Organ, von den Zoologen als „Haftorgan" bezeichnet, da man die Daphnien manchmal mit dem Rücken an Blattflächen der Pflanzen angeheftet findet, bildet sich beim erwachsenen Tiere rasch zurück und läßt sich dann nicht mehr färben. Wie es sich überhaupt als eine feste Regel ergeben hat, daß der Beginn und das Aufhören einer normalen Organfunktion sich durch die betreffende Vitalfärbung exakt darstellen läßt. Nur normal funktionierende Zellen färben sich in normaler Weise.

Die genaue Untersuchung hat ergeben, daß das „Haftorgan" ganz sicher kein Haftorgan ist. Es fehlt jeder Schleim, Klebstoff, Sekret oder sonstige Verbindungsmittel oder Gewebe, mit dem ein Anhaften zu erzielen wäre. Vielmehr ist *das „Haftorgan" unzweifelhaft das Atmungsorgan der jungen Daphnien.* Von dem Augenblick, in dem seine spezifische Färbung aufhört, von dem Augenblick an beginnt die Färbung der Bronchialsäckchen mit den gleichen charakteristischen Farbstoffen. Das Anheften der Blätter ist eine chemotaktische Bewegung des sehr sauerstoffbedürftigen Tieres, das hier seinen Atmungsbedarf direkt von den assimilierenden Wasserpflanzen deckt. Nachdem einmal die Färbungen den Weg gewiesen hatten, ergaben sich auch andere Tatsachen, welche das Resultat bestätigen. So wichtig auch das Gestaltliche eines anatomischen oder histologischen Bildes ist, die Umrisse seiner Stoff- und Energiebewegung, die aus systematischen Lebendfärbungen deutlich sich abzeichnen, sind doch wohl das Primäre. Sie geben uns einen direkten Hinweis darauf, welche Organfunktion das betreffende Gewebe hat. Man entdeckt mit ihnen gleichsam neue Organe, auch wenn diese rein optisch schon früher beobachtet worden waren, an denen man aber nur aus den äußeren Anzeichen herumraten konnte, welche Funktion in der Arbeitsteilung des Organismus ihnen obliegt.

Obzwar wir heute in der Lage sind, die Atmungsfunktion des sogenannten Haftorgans der jungen Daphnie rein chemisch-physiologisch zu begründen, so haben wir doch danach getrachtet, daß nicht nur die charakteristischen Reagenzien zeitlich am Haftorgan einsetzen, solange sie an den Kiemensäckchen noch nicht wirksam sind, sondern haben auch die

Netzmaschen und Netzlücken, die charakteristischen morphologischen Merkmale des Atmungsgewebes dieser Familie, ausgefärbt.

Wir haben dann beim Herannahen der wärmeren Jahreszeit auch frisch ausgeschlüpfte, wenige Tage alte *Kaulquappen* nach unseren Methoden untersucht. Sie zeigen, solange die Kiemen funktionieren, was nur ganz kurze Zeit dauert, eine sehr schöne Zeichnung von anodischen Orten, die die rollenähnlichen Fortsätze wie Halbmonde umspinnen. Der Versuch, Reduktionsmittel oder kathodische Farbstoffe in das Innere der Kiemenfortsätze hineinzubringen, solange sie leben und funktionieren, schlug zumeist fehl. Es ist dies eine allgemeine Regel aller normal lebenden Zellen, daß Kationen und kathodisch wandernde Farbstoffe sehr schwer in das Innere der Zellen einzubringen sind. Die vorstehend geschilderten Reaktionen an Kiemen der niederen Tiere und an Atmungskapillaren der Würmer sind eine Ausnahme von dieser allgemeinen Erfahrung. Diese Atmungsorgane haben im Gegensatz zu anderen Zellen negative Oberflächen.

Wenn man die Kapillaren der Kaulquappe mit so starken Reagenzien behandelt, daß sie geschädigt werden und daß der Kreislauf in ihnen stockt, so lassen sie eine Negativität ziemlich deutlich erkennen.

Der Mechanismus der Atmung wird durch die hier festgestellte Verteilung elektronegativer und -positiver Stellen nicht gerade durchsichtiger. Der kritische Leser wird finden, daß die Atmung sich einfacher erklären ließ, solange man den elektrostatischen Faktor der Bewegung des Zellinhaltes und seiner Zufuhren und Abfuhren nicht gekannt oder vollständig ignoriert hat. Trotzdem ist an der Tatsächlichkeit der differenten Elektrizitätsverteilung nicht zu zweifeln, und die Atmungstheorie wird sich irgendwie damit auseinandersetzen müssen, daß die bis jetzt untersuchten Tiere eine auffallende Elektronegativität der Atmungskapillaren als Ganzes erkennen lassen, und daß in den Atmungsorganen auch starke und charakteristische Anoden nicht fehlen. Wir haben uns naturgemäß verschiedene Hypothesen zurechtgelegt, um eine Mitwirkung des elektrischen Faktors an der Atmung an der Hand des mikroskopischen Bildes mit den bisherigen Versuchsergebnissen in Einklang zu bringen. Diese Annahmen scheinen uns aber bei dem jetzigen Stande der experimentellen Untersuchung noch verfrüht zu sein. Wir hoffen, die Versuche vielleicht später an verschiedenen Tierklassen fortsetzen zu können.

Die *Lungen* höherer Wirbeltiere zu untersuchen, haben wir keine Gelegenheit gehabt. Aus der Literatur der Lebendfärbung ist jedoch zu entnehmen, daß auch sie auffallend starke *Kathoden* enthalten. Zunächst haben Färbungen mit *Kongorot*[1]), einem besonders spezifischen Reagens auf negative Punkte, ergeben, daß die Grundmasse des Epithels der Alveolen auffallend kathodisch reagiert, aber auch positive Granula enthält. Ein anderes Anzeichen der Negativität ist

---

[1]) Zeitschr. Zellen- u. Gewebelehre 1, 576, 1925.

die Schnelligkeit, mit der die Lunge höherer Tiere eingespritztes Wasser resorbiert. Wasser geht unter gewöhnlichen physiologischen Verhältnissen (aber nicht bei saurer Reaktion) den Weg zur Kathode. Nach der Schnelligkeit, mit der es von dem Lungenepithel aufgenommen wird, kann man mit einer starken Negativität dieses Epithels rechnen[1]). Nach *Sehrwald* folgt Gentianaviolett, in die Lunge aspiriert, dem Wege der Lymphkapillaren. (Gentiana ist in stark verdünnter Lösung ein Anodenreagens.)

Da die Grundmasse der meisten lebenden Gewebe erheblich negativ ist, so läßt die besondere Elektronegativität des Atmungsgewebes eine besondere Wirksamkeit des elektrischen Faktors bei der Atmung vermuten.

Zusammenfassend sei hervorgehoben:

1. Die Atmungsorgane der niederen und der höheren Tiere sind negativer als das benachbarte Gewebe.

2. Die Atmungsorgane heben sich auch ab durch einen großen Reichtum an Reduktionsorten und durch eine ein wenig stärkere Alkalität als ihre Nachbargewebe.

3. Es fehlen jedoch nicht charakteristische positive Punkte und Oxydationsorte in den Atmungsorganen. Sie verteilen sich in verwandten Organismen in ähnlicher Anordnung, sind namentlich in einigen Granulas konzentriert. Anodizität und Oxydationsorte fallen in den Atmungsorganen immer zusammen.

4. Naszierender Sauerstoff oder gewisse sauerstoffabgebende Verbindungen (H_2O_2) werden von negativen Punkten (Kathoden) angezogen, Kohlensäure von ihnen abgestoßen.

[1]) *Laqueur*, Allgemeine Physiologie, Band Atmung II, 1, S. 473, 1925.

Kataphorese von Zuckern unter physiologischen Bedingungen.

Von

R. Keller und **J. Gicklhorn.**

(Aus dem Institut für theoretische Physik an der Deutschen Universität, Prag.)

(Eingegangen am 23. November 1925.)

Die Wanderung von Glucose im elektrischen Stromgefälle ist ein für den Physiologen hochinteressantes Problem. Das braucht wohl nicht erst besonders erläutert zu werden. Namentlich wenn man von der Arbeitshypothese ausgeht, daß den Stoffen in der lebenden Zelle für ihre mikroskopischen Ortsveränderungen kaum eine andere bewegende Kraft zur Verfügung steht als die elektrostatische Coulombkraft, die, wie es sich in den letzten Jahren quantitativ erwiesen hat, auch die einzige Kraft ist, die Atome und Atomteile bewegt, verbindet und voneinander löst, wird der Wanderungssinn der Glucose geradezu zu einem Zentralproblem der physiologischen Chemie. Da die Glucose im Körper vorzugsweise oxydiert wird, so muß die Glucose zunächst einen anodischen Wanderungssinn haben, da aber die genauere Untersuchung der Zuckeroxydation und der Gärung durch *Neuberg*, *Meyerhof* und *Hill* übereinstimmend ergeben hat, daß die Zuckerverbrennung keineswegs eine einfache Oxydation ist, sondern ein gekoppeltes System von Oxydationen und Reduktionen mit einem Überschuß auf der oxydativen Seite, so erscheint es wahrscheinlich, daß die Glucose, zumindest aber ihre Teiloxydationsprodukte auch einer kathodischen Einwirkung unterliegen. Es wäre im höchsten Maße wünschenswert, daß andere Untersucher als wir dieses Problem nach seiner elektrochemischen und namentlich nach seiner analytischen Seite bearbeiten würden, da es uns an der Vertrautheit mit den konstitutionschemischen und analytischen Methoden gebricht, die zur genaueren Aufhellung der komplizierten Elektrolysen und Elektrosynthesen notwendig sind. Die Spezialfachleute werden hoffentlich aus unseren Vorarbeiten entnehmen können, daß die Bearbeitung dieses Problems sehr aussichtsreich ist.

Die anodische Wanderung von Zucker wurde noch wahrscheinlicher nach den Versuchen von *Wertheimer*[1]) (1925) über die Permeabilität der lebenden Froschhaut.

Nach diesen Versuchen, gesehen vom Standpunkt unserer Theorie, gehört Glucose im lebenden Objekt zu den typischen *Anoden*stoffen, und zwar unter sonst gleichen Umständen. Wenn *Wertheimer* innen Ringerlösung, außen aber destilliertes Wasser hatte, so wanderte Glucose umgekehrt von außen nach innen.

Wir haben nun Glucose in dem vorher angegebenen *Fürth*schen Apparat wandern lassen. Wie erwartet, ging sie nahezu *rein zur Anode*, und zwar sowohl im Wasser, als in Ringer und in Alkali. Den Versuch mit Ringer gegen Wasser wollen wir später, wenn uns dazu Gelegenheit wird, ebenfalls kataphoretisch nachzuahmen versuchen. In saurer Lösung wird Glucose umgeladen und geht nunmehr *zur Kathode*.

Wir haben noch einige andere Zucker wandern lassen und haben andere in Vorbereitung. Bisher wandern alle gleichsinnig wie Glucose, nur Lävulose verhält sich kathodischer, wir glauben, daß unsere Lävulose nicht rein ist.

Bei diesem Anlaß mag vielleicht noch Erwähnung finden, daß auch *Insulin*[2]) sich sehr ähnlich verhält. Es hat den isoelektrischen Punkt p_H 5, d. h. es wandert im neutralen Milieu oder bei Blutalkalität (p_H 7) zur Anode, in saurem Milieu von etwa 110 Millivolt Acidität gegen Wasser angefangen zur Kathode.

Für eine eingehende Bearbeitung dieses Problems wäre es notwendig, Glucose, Brenztraubensäure, Acetaldehyd, Milchsäure, Lactacidogen, Glycerin nicht nur auf ihren Wanderungssinn zu prüfen, sondern auch ein wenig Stromstärke zuzulassen und eine Zeitlang zu warten, so daß Elektrolysen eintreten, gerade das, was in der *Fürth*schen Anordnung zu vermeiden gesucht wird. Bei dieser Anordnung handelt es sich darum, den Wanderungssinn im elektrischen Felde frei von allen Nebenerscheinungen, Elektrolyse, Säurebildung, Alkalibildung, Wasserströmung usw., zu studieren, in der lebenden Zelle kommen jedoch nach der herrschenden Elektrophysiologenansicht nicht oder nicht bloß statische Spannungen in Betracht, sondern auch Ströme, die also Elektrolysen ergeben müßten. Wir mußten Versuche mit erheblicher Stromstärke und elektrolytischer Wirkung auch aus dem Grunde vorläufig unterlassen, weil wir höchstens die erwarteten Produkte hätten notdürftig nachweisen können. Bei diesen Elektrolysen werden höchstwahrscheinlich Stoffe auftreten, die wir mit unserer Erfahrung und unseren Mitteln kaum hätten identifizieren können.

Zu diesen Ergebnissen tatsächlicher Natur seien noch ein paar Worte über unsere Vorstellungen hypothetischer Natur hinzugefügt, damit man erkennt, wohin ungefähr weitere Experimente unseres Erachtens zu zielen hätten. Der quergestreifte Muskel, dessen Elektroanatomie infolge zahlreicher makroskopischer und mikroskopischer Versuche am ehesten zu erkennen ist, besteht, ganz roh gesprochen, aus einem an der Außenfläche positiven Häutchen, das sich in derselben Elektrokonfiguration bis in die

[1]) Pflügers Arch. 208, 670, 1925, und zahlreiche frühere Veröffentlichungen.

[2]) Sammelreferat von *Laqueur*, Ergebn. d. Physiol. 1925.

feinsten Fibrillen fortsetzt. Als der negativste Punkt erscheint die Oberfläche der roten Blutkörperchen in den feinen arteriellen Kapillaren, sehr stark negativ sind ferner die anisotropen Scheibchen. Demgegenüber sind wohl die positivsten Punkte die Oberfläche der feinsten Nervenverzweigungen und Endplatten, dann die *J*-Punkte der isotropen Scheibchen. Wie bekannt, ist jede Muskelfibrille ein Schlauch, angefüllt mit (negativem) Sarkoplasma, das einige (positive) Granula enthält, und in dem die Scheibchen der Querstreifung eingekapselt sind. Die Glykogengranula scheinen positiv zu sein.

Nach den Beobachtungen von *Höber*, die von allen Nachuntersuchern bestätigt wurden, ist der Erregungszustand aller Gewebe dadurch charakterisiert, daß die Permeabilität der Zellgrenzflächen plötzlich erhöht wird. Diese Beobachtung stimmt auch mit unseren Erfahrungen. Wir drücken das so aus, daß wir sagen, während der Erregung geht mehr Strom durch. Dieser Strom muß nach bekannten elektrochemischen Grundgesetzen (*Faraday*) zumindest Ionen transportieren, also permeieren lassen, nach unseren Beobachtungen neben den ganz fein dispersen Ionen je nach der Porosität auch fein und grobdisperse Kolloide.

Was geschieht also während der Erregung des Muskels? Höchstwahrscheinlich geht der Traubenzucker und die vorhandene Phosphorsäure der Phosphate oder des Lactacidogens, vielleicht der ganze Lactacidogenkomplex in der Muskelfibrille zur Anode, wo er nach den allgemeinen Regeln der organischen Elektrochemie teilweise oxydiert wird. Hierbei muß die isotrope Platte der Fibrille, die ohnehin etwas saurer ist als die anisotrope Platte durch Phosphorsäure, Milchsäure, Kohlensäure (letztere beiden vermutlich Anodenprodukte der Kohlehydrate) stark sauer werden. In diesem sauren Milieu würden alle Neutralstoffe vom Typus Traubenzucker, soweit solcher noch unoxydiert vorhanden ist, vielleicht auch die Milchsäure, gebunden an irgend ein neutrales Kolloidpartikel, zur mikroskopisch nahen anisotropen Elektrode zurückgeschleudert und dort reduziert, dabei die Milchsäure anscheinend wieder zu Zucker und Glykogen rückverwandelt werden. Diese Möglichkeiten ergeben sich aus den Arbeiten von *Meyerhof* und *Hill*. Es ist nicht klar, weshalb die Milchsäure so lange an der Kathode festgehalten wird (sie müßte in der stark alkalischen anisotropen Platte wieder sofort zur Anode zurückgestoßen werden), aber es scheint nach unseren heutigen elektrochemischen Erfahrungen unvorstellbar, wie Milchsäure in einem hochgespannten, elektrisch-differenten Milieu anderswo reduziert werden kann als an der Kathode. An den Anoden versagen die stärksten Reduktionsmittel.

Wir möchten nicht unterlassen, darauf hinzuweisen, daß uns *Wertheimers* Versuchsanordnung, wenngleich zu anderen Zwecken entworfen, eine sehr gute Methode ist, um den elektrischen Wanderungssinn von farblosen Stoffen zu untersuchen, weil sie sofort nicht bloß den physikalischen Wanderungssinn gibt, der für die theoretische Fundamentierung des elektrischen Faktors der Stoffwanderung allerdings unentbehrlich ist, sondern gleich den *biologischen* Wanderungssinn zeigt, d. h. die Kataphorese in Gegenwart der Biokolloide und unter den Verhältnissen der lebenden Zelle (Aciditätsgrad, Dielektrizitätskonstante, arteigene Spannung und Stromstärke, Anwesenheit von Adsorptionsstoffen und Membranen aus dielektrischen Substanzen). Unsere pflanz-

lichen und tierischen Testobjekte, die bei direkt sichtbarem Farbstoff ganz verläßlich sind, müssen natürlich versagen, sobald es sich darum handelt, gerade die interessantesten körpereigenen Stoffe wandern zu lassen, da diese ohnehin in den meisten Zellen anwesend sind. *Wertheimer* kann mit seiner Methode ganz beträchtliche, leicht analysierbare Mengen durch die Froschhaut wandern lassen und ihre Kataphorese quantitativ erfassen.

Es ist im höchsten Grade wahrscheinlich, daß Muskeln und andere tierische Gewebe im Ruhezustand sehr wenig Strom aufweisen, dagegen größtenteils statische Spannungen, erst im Augenblick der Erregung scheint eine Isolierung durchbrochen zu werden und die Stromstärke zu merkbarer Größe anzusteigen.

Zusammenfassung.

Glucose wandert unter gewöhnlichen Umständen und unter der Acidität des Säftemilieus zur Anode, alle untersuchten Zucker lassen sich in saurem Milieu und unter noch nicht genau ermittelten Bedingungen auf Wanderungssinn zur Kathode umladen, Insulin wandert ebenfalls anodisch.

Die Reaktion vom neutralen und destillierten Wasser.

Von

J. M. Kolthoff.

(Aus dem pharmazeutischen Laboratorium der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 24. November 1925.)

1. Vollkommen neutrales Wasser hat eine Wasserstoffionenkonzentration, welche gleich der Wurzel der Ionisationskonstante des Wassers ist. Bei 22° wird p_H also 7,0 sein, bei 22° 7,1. Wenn derartiges neutrales Wasser mit der Luft in Berührung kommt, nimmt es sehr schnell Kohlensäure auf, wodurch die Wasserstoffionenkonzentration stark zunimmt. Wenn die Atmosphäre außer Kohlensäure weiter keine sauren Dämpfe enthält, so ist die maximale Wasserstoffionenkonzentration erreicht, wenn das Wasser im Gleichgewicht ist mit der Kohlensäurespannung der Luft. Weil letztere im Mittel 0,3 Vol.-Proz. Kohlendioxyd enthält, und der Verteilungskoeffizient zwischen Wasser und Gasphase etwa 1 ist, so enthält das Wasser beim Gleichgewichtszustand an der Luft etwa 0,3 ccm Kohlendioxyd im Liter, entsprechend einer Konzentration von $1{,}35 \cdot 10^{-5}$ molar. Weil ein Teil der Kohlensäure dissoziiert ist, so ist die totale Konzentration etwas größer, und zwar die Summe von $1{,}35 \cdot 10^{-5}$ und dem dissoziierten Teil. Durch Umrechnung finden wir dann, daß Wasser in Gleichgewicht mit normaler Luft einen Kohlensäuregehalt von etwa $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ molar hat. Eine derartige Lösung hat eine Wasserstoffionenkonzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ oder ein p_H von 5,70. Wenn destilliertes Wasser ein p_H kleiner als 5,7 hat, was sehr oft der Fall ist, so enthält es gewöhnlich einen Überschuß an Kohlensäure. Wenn das Wasser jedoch nach Aeration (Lüften) mit gewöhnlicher Luft, so daß der Überschuß an Kohlensäure entfernt wird, ein p_H kleiner als 5,7 hat, so ist es verunreinigt mit sauren Dämpfen. Wird das p_H größer als 5,7, so ist das Wasser von alkalisch reagierenden Substanzen verunreinigt.

Zusammenfassend ergibt sich also, daß das p_H von gutem Wasser zwischen p_H 7 und 5,7 schwankt, abhängig vom Kohlensäuregehalt.

2. Die genaue Bestimmung der Reaktion von Wasser ist eine ziemlich schwere Aufgabe. Die potentiometrische Methode gibt uns keine zuverlässigen Resultate, weil der Widerstand der zu messenden

Kette so außerordentlich groß ist, das Wasser keine Pufferwirkung hat, und das platinierte Platin eine selektive Adsorption für Wasserstoff- oder Hydroxylionen ausüben kann. Zwar haben *H. T. Beans* und *E. T. Oakes*[1]) versucht, das p_H im neutralen Wasser nach einer bestimmten potentiometrischen Methode zu bestimmen, jedoch können wir die von ihnen gefundenen Werte nicht als richtig annehmen (sie fanden ein p_H im neutralen Wasser von 7,91!).

Wegen der Unzuverlässigkeit der potentiometrischen Methode sind wir auf die kolorimetrische angewiesen. Aber auch bei der Anwendung dieser Methode bei der Bestimmung von p_H in Flüssigkeiten, die praktisch keine Pufferwirkung haben, kann man große Fehler machen.

Seit vielen Jahren habe ich regelmäßig das p_H vom gewöhnlichen destillierten Wasser und vom Leitfähigkeitswasser mit Methylrot als Indikator bestimmt, und dabei ein p_H gefunden, das zwischen 5,0 und 5,3 schwankte! Sogar nach dem Auskochen nahm ich im neutralen Wasser eine derartige, scheinbar stark saure Reaktion wahr. Dennoch geben verschiedene Autoren an, daß neutrales Wasser auf Methylrot alkalisch reagiert, und auch in meiner Monographie komme ich zu dem ganz fehlerhaften Ausspruch: „Neutrales Wasser soll auf Methylrot alkalisch reagieren"[2]).

Es zeigte sich, daß Wasser mit einer Leitfähigkeit bei 18° von $0{,}6 \cdot 10^{-6}$ reziproken Ohm, und das kohlensäurefrei war, dennoch auf Methylrot ein p_H von 5,1 aufwies. Auch mit anderen Indikatoren habe ich Abweichungen vom richtigen Werte konstatiert.

Die Ursache des Fehlers liegt nun im sauren Charakter der verwendeten Indikatoren. Bekanntlich verhalten sich diese Substanzen wie schwache Säuren oder Basen. Weil wir nun die kolorimetrische Methode fast immer in Puffermischungen anwenden, so ändert sich das p_H derselben durch den Zusatz einer Spur von einer Indikatorsäure oder -base gar nicht. Ganz anders ist es in schlecht gepufferten Lösungen. Auch durch Zusatz von einer Spur Methylrot ändert sich das p_H von neutralem Wasser stark nach der sauren Seite. Obgleich Methylrot auch einen schwach basischen Charakter hat[3]), so haben wir bei seinem Umwandlungsintervall zwischen p_H 4,4 bis 6,2 nur seine sauren Eigenschaften zu betrachten, weil der basische Charakter so außerordentlich schwach ist. Nach meinen Bestimmungen[3]) ist die Dissoziationskonstante des Methylrots als Säure bei Zimmertemperatur gleich

---

[1]) *Beans* und *Oakes*, Journ. Amer. Chem. Soc. 42, 2116, 1920.

[2]) *Kolthoff*, Der Gebrauch von Farbenindikatoren, 2. Aufl., S. 155.

[3]) *Kolthoff*, Rec. Trav. Chim. 44, 75, 1925, wo auch mehrere Literatur angegeben ist.

$9 \cdot 10^{-6}$. Gewöhnlich verwendet man als Indikatorlösung eine 0,2proz. Lösung des Methylrots in 90proz. Alkohol, von der man gewöhnlich einen Tropfen zu 5 ccm Flüssigkeit hinzufügt.

In der folgenden Tabelle habe ich nun berechnet, wie die Wasserstoffionenkonzentration vom neutralen Wasser durch Zusatz von sehr kleinen Mengen Methylrot wird.

Wasserstoffionenkonzentration in sehr verdünnten Methylrotlösungen.

Menge 0,2 proz. Indikator auf 5 ccm Wasser	Molare Methylrot-konzentration	Wasserstoffionen-konzentration	p_H
0,05 ccm	$7{,}4 \cdot 10^{-5}$	$2{,}2 \cdot 10^{-5}$	4,7
0,02 „	$3 \cdot 10^{-5}$	$1{,}2 \cdot 10^{-5}$	4,92
0,007 „	$1 \cdot 10^{-5}$	$6{,}0 \cdot 10^{-6}$	5,22
0,003 „	$4 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	5,52

Nach diesen Berechnungen soll Methylrot in neutralem Wasser also immer eine ziemlich stark saure Reaktion aufweisen. Sogar mit 0,003 ccm 0,2proz. Indikator auf 5 ccm Lösung findet man noch ein p_H von 5,5. Das p_H, das wir mit Methylrot in neutralem Wasser bestimmen, ist also immer ganz falsch, und der Wert hängt von der zugesetzten Indikatormenge ab.

Praktisch wurde dies auch bestätigt. Ich fügte zu 5 ccm verschiedene Mengen einer sehr verdünnten Methylrotlösung und verglich die Farbe mit denen von Puffermischungen. Zur Vergleichung sind die Resultate in folgender Tabelle auch auf eine 0,2proz. Methylrotlösung umgerechnet (vgl. obenstehende Tabelle).

Wahrgenommenes p_H in Wasser mit Methylrot.

Menge Indikator in Wasser auf 5 ccm Wasser	p_H in			
	kohlensäurefreiem Leitfähigkeitswasser	gewöhnlichem Leitfähigkeitswasser	kohlensäurefreiem destillierten Wasser	gewöhnlichem Wasser
0,05 ccm 0,2proz. Methylrot	4,95	4,9	4,95	4,9
0,025 „ 0,2 „ „	5,05—5,1	5,0	5,05	5,0
0,01 „ 0,2 „ „	5,35	5,2	—	—
0,005 „ 0,2 „ „	5,8	5,45	5,75	5,4

Die Übereinstimmung zwischen den berechneten und gefundenen Werten ist befriedigend. Die bestimmten Werte von p_H sind etwas größer als die berechneten; jedoch haben wir zu bedenken, daß wir die Farbe in elektrolytfreiem Wasser vergleichen mit der, welche der Indikator in Puffermischungen hat mit einem Salzgehalt von etwa 0,05 molar. Darin haben wir einen kleinen Salzfehler[1]).

[1]) Vgl. dazu *J. M. Kolthoff*, Rec. Trav. Chim. **44**, 275, 1925.

Ebenso wie Methylrot weisen auch andere Indikatoren mit saurem Charakter eine zu saure Reaktion in Wasser auf. Daher sind die gewöhnlichen Lösungen von Bromkresolpurpur, Chlorphenolrot, Bromthymolblau auch nicht brauchbar zur genauen Bestimmung vom p_H des Wassers. p-Nitrophenol hat eine viel kleinere Dissoziationskonstante, und zwar etwa von 10^{-7}, und hat daher einen kleineren „Säurefehler". Doch ist es für die genaue Beurteilung des p_H vom Wasser nicht zu empfehlen[1]).

W. Olszewski[2]) empfiehlt für eine orientierende Bestimmung eine Lackmuslösung (bezogen von *Kahlbaum*). Weil letztere jedoch schlecht definiert ist, kann sie keine genauen Resultate liefern. Zur genauen Bestimmung fügt *Olszewski* daher zu 100 ccm Wasser 0,4 ccm einer 0,04 proz. Bromthymolblaulösung. Neutrales Wasser soll dann eine grünliche Farbe haben. Weil *Olszewski* mit einer so stark verdünnten Indikatorlösung arbeitet, wird der „Säurefehler" viel kleiner, als wenn man unter gewöhnlichen Verhältnissen arbeitet. Jedoch kann man in der angegebenen Weise auch nicht den genauen Wert vom p_H in Wasser finden.

3. Weil die verschiedenen genannten Indikatoren wegen ihres sauren Charakters eine unrichtige Wasserstoffionenkonzentration in Wasser aufweisen, so läßt sich leicht verstehen, daß man bessere Resultate erhalten wird, wenn man die saure Gruppe neutralisiert, und mit dem neutralen Salze des Indikators arbeitet. In der Tat erhält man in dieser Weise vorzügliche Resultate.

W. M. Clark[3]) verwendet von den von ihm mit *Lubs* eingeführten Indikatoren immer die neutralisierten Lösungen. Für meine Versuche verwendete ich nun auch derartige Salzlösungen, welche am einfachsten in folgender Weise hergestellt wurden: Zu 100 mg Sulfophthalein fügt man 10 ccm starken Weingeist und erwärmt, bis der Indikator gelöst ist. Dann fügt man die äquivalente Menge Lauge hinzu, welche für Bromthymolblau 1,6 ccm n/10, für Chlorphenolrot 4,2 ccm und Bromkresolpurpur 1,85 ccm n/10 beträgt, und füllt dann mit Wasser bis zu 100 ccm auf. Vom Methylrot löste ich 286 mg (= 1 mmol.) in 40 ccm starkem Weingeist, fügte 10 ccm n/10 Lauge hinzu und füllte mit Wasser bis zu 200 ccm auf. Zubereitungen von *Merck* und *Kahlbaum* gaben für meine Zwecke besser brauchbare Lösungen als die von anderen Firmen.

---

[1]) *H. A. Fales* und *J. M. Nelson*, Journ. Amer. Chem. Soc. **37**, 2769, 1915, fanden in Wasser mit p-Nitrophenol als Indikator ein p_H von 5,8.

[2]) W. *Olszewski*, Pharm. Zentralh. **65**, 129, 1924; Chem.-Ztg. **48**, 309, 1924.

[3]) *W. M. Clark*, The Determination of hydrogenions, 2. Aufl. Baltimore 1922.

Für die Beurteilung der Reaktion vom gewöhnlichen destillierten Wasser ist die neutralisierte Methylrotlösung (welche wir im folgenden als M. R. Na andeuten werden) am geeignetsten. Mit dieser Lösung fand ich z. B. die folgenden Resultate:

Reaktion von Wasser auf M. R. Na: 0,04 bis 0,08 ccm auf 5 ccm Wasser.

Art des Wassers	p_H
Gewöhnliches destilliertes Wasser	5,65
" " " (gelüftet)	5,9
Leitfähigkeitswasser	5,85
" im Gleichgewicht mit der Luft	6,0
Neutrales Wasser (kohlensäurefrei)	> 6,2

Aus dieser Tabelle sehen wir, daß neutrales Wasser im Gleichgewicht mit der Luft ein p_H von etwa 6,0 aufweist, während der berechnete Wert 5,7 ist. Unten komme ich ausführlicher auf diese Abweichung zurück.

Aus den Zahlen ergibt sich, daß destilliertes Wasser von guter Qualität auf Methylrotnatrium ein p_H aufweist, größer als 5,7, während neutrales Wasser alkalisch auf den Indikator reagiert. Statt Methylrotnatrium ist auch die neutralisierte Chlorphenolrotlösung zu verwenden. Gewöhnliches destilliertes Wasser gab damit ein p_H von 5,5, nach dem Durchleiten von gewöhnlicher Luft von 5,9, während Leitfähigkeitswasser, das nicht kohlensäurefrei gemacht worden war, ein p_H von 5,7 aufwies.

Weil der Indikator beim p_H von 5,4 fast vollständig gelb gefärbt ist, und die Intensität der roten Farbe bei steigendem p_H regelmäßig zunimmt, kann man nach einiger Übung, auch ohne Puffermischungen zu verwenden, die Qualität des Wassers mit Chlorphenolrotlösung leicht beurteilen.

Wie wir oben gesehen haben, reagiert neutrales Wasser vollkommen alkalisch auf Methylrot. Zur Bestimmung vom p_H des neutralen Wassers ist die neutralisierte Bromthymolblaulösung der angewiesene Indikator. Wiederholt habe ich Leitfähigkeitswasser und gewöhnliches destilliertes Wasser durch Kochen kohlensäurefrei gemacht. Das Auskochen muß natürlich in Glas von guter Qualität geschehen (Jena- oder Pyrex- oder Resistenzglas und dergleichen). Um das Wasser gegen die sauren Dämpfe der Gasflamme zu schützen, setzt man ein Natronkalkrohr beim Erwärmen auf, entfernt dieses beim Sieden und setzt beim Abkühlen wieder auf.

Es zeigte sich, daß nach einer Minute ununterbrochenen Siedens das p_H sich nicht mehr änderte, und zwar fand ich nach dem Abkühlen ein konstantes p_H von 6,6 bis 6,7. Bei diesem p_H hat der Indikator eine grünliche Farbe. Das neutrale Wasser nimmt in Berührung mit

Luft sehr leicht Spuren von Kohlensäure auf, wodurch die grüne Farbe verschwindet und die Lösung gelb wird. Wenn man neutrales Wasser nur eine Minute mit Luft schüttelt, so ist das p_H schon bis etwa 6,0 gefallen.

L. E. Dawson[1]) behauptet, daß er nach dem Auskochen von destilliertem Wasser auf Bromthymolblau ein p_H von 7,0 wahrnahm. Er kochte im Pyrexglas, bis zwei Drittel der ursprünglich anwesenden Menge des Wassers übrig waren, brachte schließlich 5 ccm in ein Reagenzglas und beurteilte neben Puffermischungen. Es ist selbstverständlich, daß man in dieser Weise gar nicht sicher ist, daß nicht Spuren Kohlensäure aufgenommen werden. Auch die geringsten Spuren dieser Säure ändern das p_H von Wasser merkbar

Aus einer Bemerkung von *Dawson* (l. c., S. 555) würde man übrigens ableiten, daß das Glas seiner Reagenzröhren Spuren Alkali abgab.

Übrigens meine ich, daß das Messen vom p_H in vollkommen neutralem Wasser nach der kolorimetrischen Methode zurzeit nicht genauer gemacht werden kann als bis zu 0,2 bis 0,3 im p_H.

Wir stehen hier vor einer besonderen Frage, bei der ganz andere Faktoren eine Rolle spielen wie bei den gewöhnlichen kolorimetrischen Methoden. Man muß ganz überzeugt sein von der Reinheit des Indikators, von dessen genauer Neutralisation usw.

Praktisch können wir mit den von uns erhaltenen Resultaten sehr zufrieden sein. Von neutralem Wasser kann man fordern, daß es mit einer neutralisierten Bromthymolblaulösung eine grünliche Farbe annimmt, die einem p_H größer als 6,1 entspricht. Hat die Lösung eine mehr blaue Farbe (entsprechend einem p_H größer als 7,0), so ist das Wasser mit Alkali verunreinigt. Wenn man neutrales Wasser längere Zeit in Glas aufbewahrt, so kann es vorkommen, daß es eine Spur Alkali aufnimmt. So untersuchte ich ein Wasser, das während einiger Monate über Natronkalk gestanden und bei 18^0 eine spezifische Leitfähigkeit von $2 . 10^{-6}$ reziproken Ohm hatte. Dieses Wasser wies mit der neutralen Bromthymolblaulösung ein p_H von 6,3 auf. Wurde dieses Wasser gekocht, so war das p_H nach dem Abkühlen 7,3.

Übrigens sei noch bemerkt, daß neutrales Wasser in Berührung mit Luft sehr schnell Spuren Kohlensäure anzieht.

Man kann nun vom neutralen Wasser fordern, daß es nicht nur ein p_H größer als 6,2 auf Bromthymolblau hat, sondern auch noch, daß die grüne Farbe des Indikators beim Schütteln mit Luft verschwindet und die Lösung rein gelb wird. In dieser Weise hat man einen einfachen Versuch auf die Anwesenheit von Spuren Alkali.

---

[1]) *L. E. Dawson*, Journ. phys. Chem. 29, 551, 1925.

Man kann natürlich Einwände machen gegen die Verwendung von neutralisierten Indikatorlösungen (vgl. unter 4.) und den Vorzug der Verwendung von einer sehr schwachen Base als Indikator geben. Ein Indikator, der sich wie eine Säure verhält, und beim p_H von 5 für die Hälfte umgeschlagen ist, hat eine Dissoziationskonstante von 10^{-5} (Methylrot). Ist die Substanz jedoch eine Base, so hat sie unter den genannten Bedingungen eine Dissoziationskonstante von 10^{-9}. Der „Basenfehler" eines derartigen Indikators ist also viel kleiner als der Säurefehler eines sauren Indikators mit demselben Umwandlungsintervall. Wenn wir zu neutralem Wasser so viel Lösung einer Base mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-9} fügen, daß die Konzentration 10^{-5} ist, so ändert sich das p_H vom Wasser fast nicht. Jedoch haben alle Indikatoren, die wir gewöhnlich beim p_H 5 bis 7 verwenden, einen sauren Charakter. In diesem Jahre habe ich jedoch auch das Verhalten von verschiedenen Methoxytriphenylcarbinolen untersucht. Diese Substanzen sind Basen und in saurer Lösung rot bis violett, in alkalischer Lösung farblos (also eben das Umgekehrte von Phenolphthalein). Unter diesen Triphenylcarbinolen gibt es eins, das nach meinen Bestimmungen eine Dissoziationskonstante von $4{,}5 \cdot 10^{-9}$ hat und also für unsere Zwecke brauchbar ist. Dieser Indikator (2, 4, 6, 2′ 4′ 2″ 4″-Heptamethoxytriphenylcarbinol) hat ein Umwandlungsintervall von 5,0 (violett) bis 7,0 (farblos). Es zeigte sich nun, daß vollkommen *neutrales Wasser mit dem Indikator ganz farblos* blieb: mit gewöhnlichem destillierten Wasser war die Farbe nach 15 Minuten Stehen schön violett ($p_H = 5{,}6$), während Wasser im Gleichgewicht mit der Luft mit diesem Indikator ein p_H von 5,9 bis 6,0 aufwies. Bei Verwendung des genannten Indikators erreicht man also den Vorteil, daß man die freie Base verwenden kann, ohne sie zu neutralisieren. An anderer Stelle werde ich ausführlicher auf das Verhalten von den Methoxytriphenylcarbinolen eingehen.

4. Gegen die Anwendung der neutralisierten Indikatorlösungen kann man zwei Einwände machen:

Erstens kann die Reaktion vom neutralen Wasser durch die Indikatorsalzlösung geändert werden, zweitens kann der Indikator mit einer eventuell anwesenden Säure eine Umwandlung geben unter Bildung von Indikatorsäure, und daher eine falsche Reaktion aufweisen.

Der erstere Fehler kann nur von untergeordneter Bedeutung sein, weil die Hydrolyse des Indikatorsalzes verhältnismäßig gering ist.

Wenn J^- das Anion des Indikators vorstellt, so wird die Hydrolyse von der folgenden Gleichung dargestellt:

$$J^- + H_2O \rightleftarrows HJ + OH^-.$$

In gewöhnlichen Fällen rechnen wir nun, daß die gebildete Menge HJ gleich der Hydroxylionenkonzentration ist. Bei sehr geringer Hydrolyse ist das jedoch nicht erlaubt, weil wir die Hydroxylionen, welche vom Wasser geliefert werden, nicht vernachlässigen dürfen.

Wenn wir die Hydroxylionenkonzentration gleich x setzen, so ist

$$[HJ] = x - [H^+].$$

Weiter ist nach der Hydrolysengleichung:

$$\frac{[HJ][OH^-]}{[J^-]} = K_{Hydr.} = \frac{K_w}{K_s}$$

K_s ist die Dissoziationskonstante der Säure).

Wenn die Konzentration $[J^-]$ des Indikatorsalzes gleich c ist, so finden wir aus beiden letzten Gleichungen:

$$x^2 - K_w = c\frac{K_w}{K_s}$$

und

$$x = \sqrt{c \cdot \frac{K_w}{K_s} + K_w}.$$

Bei Zimmertemperatur ist $K_w = 6{,}4 \,.\, 10^{-15}$; K_s von Methylrot $= 9 \,.\, 10^{-6}$; also ist $K_{Hydr} = 7 \,.\, 10^{-10}$.

So finden wir dann in einer $5 \,.\, 10^{-5}$ molaren Methylrotnatriumlösung eine $[OH^-]$ von $2 \,.\, 10^{-7}$, entsprechend einem p_H von 7,5. Bei einer Konzentration von $1 \,.\, 10^{-5}$ molar Indikatorsalz berechnen wir ein p_H von 7,25, während der theoretische Wert 7,1 ist. So können wir auch in anderen Fällen den „Hydrolysefehler" berechnen, und finden dann, daß dieser klein ist, wenn wir mit sehr geringen Indikatorkonzentrationen arbeiten.

Anders ist die Sache, wenn das Wasser eine schwach saure Reaktion hat. Fügen wir dann ein Indikatorsalz hinzu, so daß der Indikator auf Zwischenfarbe gefärbt wird, dann findet eine Umwandlung statt, bei der freie Indikatorsäure gebildet und ein Teil der ursprünglich anwesenden Säure in das Salz umgesetzt wird.

Praktisch begegnen wir diesem Falle bei der Messung der Reaktion in Lösungen von sehr schwachen Säuren, wie von Borsäure, Cyanwasserstoff, von Kohlensäure im destillierten Wasser usw.

Die Berechnung des Fehlers, den wir in der beschriebenen Weise machen, ist ziemlich kompliziert. Wenn wir annehmen, daß die Konzentration des zugefügten Indikatorsalzes NaJ gleich c_1 ist, und daß

die totale Konzentration der anwesenden Säure (im destillierten Wasser Kohlensäure) c_2 ist, dann haben wir die Umsetzung:

$$J^- + H_2CO_3 \rightleftarrows HJ + HCO_3^-$$

und finden dann:

$$[J^-] + [HJ] = c_1, \tag{1}$$

$$[HCO_3^-] + [H_2CO_3] = c_2. \tag{2}$$

(Unter $[H_2CO_3]$ verstehen wir dann die Summe von Kohlendioxyd und Kohlensäure.)

Weil die Flüssigkeit elektrisch neutral ist, ist die Summe der positiven Ionen gleich der der negativen Ionen:

$$[Na^+] + [H^+] = [HCO_3^-] + [J^-]. \tag{3}$$

Weil nun $[Na^+]$ gleich der Konzentration des zugesetzten Indikatorsalzes c_1 ist, so haben wir:

$$[H^+] = [HCO_3^-] + c_1 - [J^-] = [HCO_3^-] - [HJ]. \tag{4}$$

Aus der Gleichung für die Dissoziationskonstante einer Säure berechnen wir, daß:

$$[H^+] = \frac{[H_2CO_3]}{[HCO_3^-]} K_{H_2CO_3} = \frac{[HJ]}{[J^-]} K_{HJ} = [HCO_3^-] - [HJ]$$

oder

$$\frac{c_2 - [HCO_3^-]}{[HCO_3^-]} K_{H_2CO_3} = \frac{[HJ]}{c_1 - [HJ]} K_{HJ} = [HCO_3^-] - [HJ]. \tag{5}$$

Aus den letzten Gleichungen (5) können wir leicht eine Drittemachtsgleichung ableiten, in der $[HCO_3^-]$ oder $[HJ]$ unbekannt ist.

Weil das Lösen einer Drittemachtsgleichung jedoch nicht so einfach ist, wollen wir unten die Beurteilung des Fehlers noch in anderer Weise besprechen. Um die Sache möglichst einfach zu gestalten, gehen wir aus von dem kolorimetrisch ermittelten Werte. Wenn ich dann die Wasserstoffionenkonzentration gemessen habe, und ich kenne die totale Menge des zugefügten Indikatorsalzes c_1, dann ist die Konzentration der gebildeten Indikatorsäure leicht zu berechnen:

$$[HJ] = \frac{[H^+](c_1 - [HJ])}{K_{HJ}}$$

oder

$$[HJ] = \frac{[H^+]c}{K_{HJ} + [H^+]}. \tag{6}$$

Nach Gleichung (4) ist nun

$$[HCO_3^-] = [H^+] + [HJ]. \tag{7}$$

Wir können also die entsprechende Menge Kohlensäure berechnen, weil

$$[H_2CO_3] = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{K_{H_2CO_3}} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{3 \cdot 10^{-7}}.$$

Addieren wir zu $[H_2CO_3]$ die Menge $[HCO_3^-]$, dann finden wir schließlich die totale Menge Kohlensäure c_2. Schließlich berechnen wir das p_H einer Kohlensäurelösung von einer Konzentration c_2 und vergleichen den Wert mit dem gefundenen p_H. In dieser Weise erhalten wir also einen guten Eindruck vom gemachten Fehler.

Zur Erläuterung nehmen wir ein Beispiel, bei dem die Konzentration des zugefügten Indikatorsalzes $5 \cdot 10^{-5}$ ist ($c_1 = 5 \cdot 10^{-5}$), und das gemessene p_H 5,7, so daß $[H^+]$ gleich $2 \cdot 10^{-6}$ ist. Dann ist die Menge des undissoziierten Methylrots gleich $9 \cdot 10^{-6}$, und

$$[HCO_3^-] = 9 \cdot 10^{-6} + 2 \cdot 10^{-6} = 11 \cdot 10^{-6}$$
$$[H_2CO_3] = 3 \cdot 10^{-6}$$
$$\text{Totale Menge Kohlensäure} = 8{,}4 \cdot 10^{-5}$$

Berechnetes p_H in dieser Lösung: 5,3.

Der gefundene Wert ist 5,7, der Fehler beträgt also 0,4 im p_H. Wenn wir bei kleineren Indikatorkonzentrationen arbeiten, wird der Fehler kleiner, wie man das in folgender Tabelle angegeben findet.

Korrektur für Methylrotnatrium in verdünnten Kohlensäurelösungen.

Konzentration Methylrotsalz	Gemessen p_H	Berechneter Wert von p_H	Korrektur für den gefundenen Wert
$5 \cdot 10^{-5}$ molar	5,7	5,3	— 0,4
$5 \cdot 10^{-5}$ „	5,82	5,41	— 0,41
$5 \cdot 10^{-5}$ „	6,0	5,55	— 0,45
$2 \cdot 10^{-5}$ „	5,7	5,44	— 0,26
$2 \cdot 10^{-5}$ „	5,82	5,54	— 0,27
$2 \cdot 10^{-5}$ „	6,0	5,7	— 0,30
$1 \cdot 10^{-5}$ „	5,7	5,52	— 0,18
$1 \cdot 10^{-5}$ „	5,82	5,64	— 0,18
$1 \cdot 10^{-5}$ „	6,0	5,80	— 0,20

Wir sehen also, daß der Fehler mit abnehmender Indikatorsalzkonzentration abnimmt, wie dies auch zu erwarten war. Praktisch habe ich die theoretischen Ableitungen auch bestätigen können. Destilliertes Wasser, das mit Luft in Gleichgewicht war, zeigte mit 0,05 ccm einer $5 \cdot 10^{-3}$ molaren Methylrotnatriumlösung auf 5 ccm Flüssigkeit ein p_H von 6,0; fügte ich nun 0,015 ccm hinzu, so war das gemessene

p_H gleich 5,85. Der Berechnung nach hat ein mit Luft gesättigtes Wasser ein p_H von 5,70. Ich habe noch versucht, die Spuren Kohlensäure durch Titration mit Natron zu bestimmen. Jedoch hat man auch hier wieder verschiedene Schwierigkeiten, denen man unter mehr gewöhnlichen Verhältnissen nicht begegnet. Das Titrieren von Spuren einer schwachen Säure (Konzentrationen von etwa 10^{-5}) ist ein Problem an sich, das wir hier nicht weiter besprechen werden.

Die praktische Schlußfolgerung, die wir aus dem Obenstehenden ziehen können, ist, daß man in sehr verdünnten Säurelösungen weder mit der Lösung eines Indikatorsalzes, noch mit einer der freien Säuren die richtige Wasserstoffionenkonzentration mißt. Wenn man ganz genaue Resultate haben will, so muß man erst angenähert das p_H bestimmen, und dann zur Lösung eine Mischung von der Indikatorsäure mit ihrem Salze von einer derartigen Zusammensetzung zusetzen, daß sie dem p_H der Flüssigkeit entspricht.

Für den praktischen Gebrauch ist die Anwendung des Natriumsalzes der Indikatorsäure zu empfehlen. Die besten Resultate erhält man, wenn man auf möglichst großer Volumenlösung möglichst wenig Indikator zusetzt.

Prinzipiell ist die Anwendung einer Indikatorbase vorzuziehen.

Schließlich weise ich darauf, daß das Natriumsalz von Methylrot sehr empfindlich ist für Änderungen im Kohlensäuregehalt des Wassers. Möglicherweise kann man dann eine Anwendung machen bei der Beurteilung vom Kohlensäuregehalt in der Luft. Wenn man eine Farbenskala anfertigt, so kann man ganz genau geringe Abweichungen vom normalen Kohlensäuregehalt feststellen.

Zusammenfassung.

1. Bei der Bestimmung der Reaktion vom destillierten und neutralen Wasser auf Methylrotlösung macht man enorme Fehler. In neutralem Wasser kann man so eine Wasserstoffionenkonzentration finden, die 100mal größer als wirklich vorhanden ist.

2. Für die praktische Beurteilung vom destillierten Wasser ist die Anwendung einer Lösung vom Natriumsalz des Methylrots am meisten zu empfehlen. Wasser in Gleichgewicht mit der Luft gibt damit ein p_H von 5,9 bis 6,0.

Auch das Natriumsalz von Chlorphenolrot ist brauchbar, während eine Lösung von 2, 4, 6, 2′ 4′ 2″ 4″-Heptamethoxytriphenylcarbinol prinzipiell die beste ist.

3. Neutrales reagiert auf eine Lösung von Methylrotnatrium alkalisch. Zur Beurteilung der Reaktion vom neutralen Wasser ist das Natriumsalz von Bromthymolblau am geeignetsten.

4. Wenn destilliertes Wasser während einer Minute stark gekocht und dann abgekühlt wird (mit Natronkalkrohraufsatz), so findet man in der beschriebenen Weise ein p_H von 6,7 bis 6,6.

Schüttelt man derartiges Wasser mit Luft, so nimmt es schnell Kohlensäure auf, das p_H fällt, und die Flüssigkeit ist innerhalb einer Minute gelb, wenn das Natriumsalz von Bromthymolblau als Indikator gebraucht ist.

5. Vorgeschlagen ist, Methylrotnatrium bei der Kohlensäurebestimmung in Luft zu verwenden.

6. Die Fehler, die bei der Messung der Reaktion von sehr verdünnten Lösungen, von schwachen Säuren bei Verwendung einer Indikatorsäure bzw. von ihrem Salze gemacht werden, sind eingehend besprochen.

Die Klärung von zuckerhaltigem Harn mit Kohle.

Von

J. M. Kolthoff.

(Aus dem pharmazeutischen Laboratorium der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 24. November 1925.)

1. Obgleich die verschiedenen Zuckerarten fast gar keinen Einfluß auf die Oberflächenspannung von Wasser gegenüber Luft haben, so werden sie doch merkbar von verschiedenen Kohlensorten adsorbiert[1]). Eingehende Untersuchungen, über welche demnächst berichtet werden wird, haben gelehrt, daß die Adsorption der Zucker unter bestimmten Verhältnissen sehr beträchtlich sein kann.

Die Sache ist nicht nur von theoretischem Interesse, sondern auch von praktischer Bedeutung. Gut adsorbierende Kohlensorten sind doch sehr geeignet zur Entfärbung von gefärbten Flüssigkeiten, und es ist unter anderen von Bedeutung, zu wissen, ob man die Kohle zu diesem Zwecke verwenden darf, wenn man im Filtrat die Zucker polarimetrisch bestimmen will. Bei der Harnuntersuchung ist besonders die Kenntnis über die Adsorption von Glucose von Bedeutung, und daher werden wir nun einige Resultate darüber mitteilen. In qualitativer Hinsicht ist das Verhalten der anderen Zuckerarten jedoch vollkommen mit dem von Glucose vergleichbar[2]).

Ich habe die Adsorption von Glucose an acht verschiedenen Kohlensorten unter wechselnden Bedingungen untersucht. Obwohl die verschiedenen Kohlensorten sich quantitativ natürlich verschieden verhielten, war qualitativ die Übereinstimmung zwischen den Resultaten sehr gut. Bekanntlich ist die adsorbierte Menge abhängig von der Endkonzentration c in der Flüssigkeit, und zwar ist nach der *Freundlich*schen Adsorptionsisotherme: $x/m = a\,c^{1/n}$.

[1]) *Wiegner*, Kolloid-Zeitschr. 8, 126, 1910; vgl. *P. Rona* und *L. Michaelis*, diese Zeitschr. **16**, 489, 1909; *P. Rona* und *K. von Töth*, ebendaselbst **49**, 288, 1914; *Brewster* und *Raines*, Ind. Engin. Chem. **13**, 1043, 1921; *Blake*, ebendaselbst **12**, 1104, 1920.

[2]) Ausgenommen Lactose, die mehr oder weniger eine besondere Rolle spielt.

x/m ist die Anzahl Millimole, adsorbiert pro Gramm Adsorbens, c ist die Endkonzentration, a und $1/n$ sind Konstanten. In dieser Gleichung beherrscht nun $1/n$ die Änderung der Adsorption mit wechselnder Konzentration, während a mehr ein Maß ist für die Adsorptionsfähigkeit der Kohle. Wenn die verschiedenen Kohlensorten sich in qualitativer Hinsicht analog verhalten, so bedeutet dies, daß die gefundenen Werte von $1/n$ in den verschiedenen Fällen dieselben sind, während die Werte von a mit zunehmender Adsorptionsfähigkeit der Kohle zunehmen. In der Tat fanden wir mit den verschiedenen Kohlen für Glucose einen Wert für $1/n$, der um 0,5 schwankte, während a für jede Kohle verschieden war.

2. Wegen der qualitativen Übereinstimmung im Verhalten der verschiedenen Kohlensorten, teile ich nur einige Resultate mit, erhalten mit „Carbo medicinalis *Merck*" und „Norit". In der letzten Zeit bringen „*Merck*" und die „Norit Maatschappy" viel besser adsorbierende Kohlen in den Handel, welche sich qualitativ genau so verhalten wie die, von denen wir die Resultate erwähnen.

Menge und Stärke der Zuckerlösung	c	x/m pro 1 g	x/m berechnet
Glucose mit 3 g Norit (wasserfrei). $1/n = 0{,}53$, $a = 1{,}32$.			
50 ccm 0,1 molar	0,080	0,333	0,348
50 „ 0,05 „	0,0355	0,240	0,230
50 „ 0,02 „	0,0119	0,127	0,126
50 „ 0,01 „	0,00513	0,082	0,081
Glucose mit 3 g Carbo medicinalis (wasserfrei) *Merck*. $1/n = 0{,}52$, $a = 1{,}74$.			
50 ccm 0,1 molar	0,0714	0,447	0,44
50 „ 0,05 „	0,0310	0,295	0,284
50 „ 0,025 „	0,0128	0,19	0,18
50 „ 0,01 „	0,00433	0,089	0,091

Aus den erhaltenen Versuchsdaten sind $1/n$ und a graphisch abgeleitet und nachher die Werte von x/m bei der Endkonzentration c berechnet. Die so gefundenen Werte von x/m sind in der Tabelle unter x/m berechnet angegeben. Wie wir sehen, findet die Adsorption nach der *Freundlich*schen Adsorptionstherme statt. Zudem sehen wir, daß die $1/n$-Werte für beide Kohlen dieselben sind, während a bei der Kohle von *Merck* größer ist als bei *Norit*. Bei größeren Endkonzentrationen als 0,2 mol. ist die Adsorptionsisotherme nicht mehr gültig; ich habe daher nun die Versuche mit verdünnteren Lösungen erwähnt.

Wie sich aus den Daten der Tabelle ergibt, ist die Adsorption von Glucose an Kohle sehr merkbar.

Zur Übersichtlichkeit gebe ich in der folgenden Tabelle die prozentuale Abnahme der Glucosekonzentration an, wenn 50 ccm Glucoselösung mit 3 g Kohle geschüttelt werden.

Stärke der Glucoselösung	Abnahme der Stärke in Prozenten nach Behandlung mit 3 g Norit Proz.	Carbo medicinalis Merk Proz.
50 ccm 0,1 molar	20	29
50 „ 0,05 „	29	38
50 „ 0,025 „	—	49
50 „ 0,02 „	40	—
50 „ 0,01 „	49	57

Hieraus könnte man die Schlußfolgerung ziehen, daß beim Entfärben von zuckerhaltigen Flüssigkeiten mit Kohle immer Glucose verloren geht. Dies ist jedoch nicht ganz richtig, denn es wäre möglich, daß zu gleicher Zeit Substanzen in der Lösung sind, die Glucose von der Kohlenoberfläche verdrängen können. So haben *P. Rona* und *K. von Töth* (l. c.) nachgewiesen, daß oberflächenaktive Substanzen wie die Säuren der Fettreihe die Adsorption der Glucose herabsetzen. Urethane haben eine derartige Wirkung. Es ist von praktischem Interesse, zu wissen, ob man durch Zusatz von bestimmten Substanze die Adsorption von Glucose ganz verhindern kann; mit anderen Worten, ob die Glucose quantitativ von der Kohlenoberfläche verdrängt werden kann. Die Versuche, welche in dieser Richtung genommen sind, sind in folgender Tabelle zusammengestellt. Weil „Norit" sich qualitativ wieder völlig analog mit „Carbo medicinalis *Merck*" verhält, so gebe ich nur die Zahlen mit letzterer Kohle gefunden.

Einfluß von fremden Substanzen auf die Adsorption von Glucose (50 ccm Zuckerlösung mit 3 g Carbo medic. *Merck*).

Zusatz	Glucose von 3 g Kohle adsorbiert Proz.	Zusatz	Glucose von 3 g Kohle adsorbiert Proz.
—	50	4 Proz. Äthylalkohol . .	12,5
0,04 n HCl	51	0,4 Proz. Amylalkohol . .	28,3
0,06 n NH_3	51	1 Proz. Valeriansäure .	25,2
2 Proz. Harnstoff . . .	54	Ges. Salicylsäurelösung	10,8
0,2 Proz. Stärkelösung .	50	1 Proz. Phenol	8,3
1 Proz. Äthylalkohol . .	42		

In Übereinstimmung mit *P. Rona* und *von Töth* (l. c.) finde ich also, daß die Wasserstoffionenkonzentration der Flüssigkeit ohne Einfluß ist auf die Adsorption des Zuckers (vgl. Versuch mit 0,04 n HCl und 0,06 n NH_3). Dieses Resultat ist von praktischer Bedeutung, denn die Adsorption von vielen Farbstoffen ist stark vom p_H abhängig. Wenn derartige Substanzen also neben Zuckern in der Lösung vor-

handen sind, so kann man bei der Wasserstoffionenkonzentration mit Kohle entfärben, bei denen die Farbstoffe am stärksten adsorbiert werden.

Weiter sehen wir, daß der Harnstoff die Adsorption von Glucose an Kohle steigert; eine verdünnte Stärkelösung hat keinen Einfluß. Kapillaraktive Substanzen setzen die Adsorption herab; besonders Phenol hat in dieser Hinsicht eine starke Wirkung.

Daher habe ich auch bei anderen Endkonzentrationen den Einfluß von Phenol auf die Adsorption von Glucose an Kohle untersucht. Die Resultate stehen in folgender Tabelle.

3 g Carbo medic. *Merck* + 50 ccm Glucoselösung.

Verwendete Zuckerlösung	Zusatz	Glucose adsorbiert Proz.
50 ccm 0,1 molar	—	29
50 „ 0,1 „	1 Proz. Phenol	9
50 „ 0,05 „	—	38
50 „ 0,05 „	1 Proz. Phenol	8
50 „ 0,025 „	—	48
50 „ 0,025 „	1 Proz. Phenol	11,1
50 „ 0,025 „	1 Proz. Phenol + 0,04 n HCl	1,5
50 „ 0,025 „	1 „ „ + 0,06 n NH_3	6

Besonders auffallend ist hier der Einfluß von Salzsäure bei Anwesenheit von Phenol. Während die Wasserstoffionenkonzentration, wie wir gesehen haben, keinen Einfluß hat auf die Adsorption von Glucose, wird der verdrängende Einfluß von Phenol auf Glucose durch Säure stark befördert. Mit Noritkohle habe ich derartige Erscheinungen wahrgenommen, welche ich theoretisch nicht zu deuten weiß.

Auf die Adsorption von anderen Zuckerarten übt Phenol ebenso wie auf Glucose einen verdrängenden Einfluß aus. Besonders stark ist die Wirkung auf die Verdrängung von Saccharose. Folgende Tabelle gibt davon einige Zahlen.

3 g Carbo medic. *Merck* mit Saccharose.

Verwendete Lösung	Zusatz	Saccharose adsorbiert Proz.
50 ccm 0,25 molar	—	8
50 „ 0,25 „	1 Proz. Phenol	0,8
50 „ 0,125 „	—	13
50 „ 0,125 „	1 Proz. Phenol	0,7
50 „ 0,05 „	—	26
50 „ 0,05 „	1 Proz. Phenol	0,03

3. Obgleich die verschiedenen Zuckerarten, wie wir gesehen haben, stark von Kohle adsorbiert werden, so scheint es doch noch möglich

zu sein, Kohle zur Entfärbung von gefärbten Flüssigkeiten zu verwenden, ohne Zucker zu verlieren. Wenn der Farbstoff nämlich viel stärker adsorbiert wird als der Zucker, so wäre es möglich, daß bei Verwendung der minimalen Menge Kohle, die eben benötigt ist zur Entfärbung der Flüssigkeit, noch kein Zucker adsorbiert wird.

Einem derartigen Fall begegnen wir beim Harn. Es ist möglich, Harn praktisch vollständig zu entfärben, ohne daß Zuckerverlust auftritt.

Ich habe eine große Reihe Versuche gemacht mit verschiedenen menschlichen Harnsorten, zu denen verschiedene Mengen Glucose hinzugefügt wurden. Sodann wurde der Harn mit wechselnden Mengen Noritkohle 1 Stunde geschüttelt und die Glucose im Filtrat entweder kolorimetrisch nach *Summer* (bei geringem Zuckergehalt) oder titrimetrisch mit *Fehling*scher Lösung bestimmt. Natürlich wurden alle Resultate verglichen mit denen, welche unter denselben Verhältnissen mit dem nicht behandelten Harn erhalten wurden.

In den beiden folgenden Tabellen gebe ich einige der gefundenen Resultate.

50 ccm Harn mit 1 Proz. Glucose mit Norit.

Menge Norit mg	Zusatz	Zuckergehalt des Filtrats Proz.	Zuckerverlust der totalen Menge Proz.
50	—	1,0	0,0
100	—	1,0	0,0
250	—	0,98	2,0
500	—	0,965	3,5
1000	—	0,93	7,0
250	1 Proz. Phenol	0,99	1,0
1000	1 „ „	0,95	5,0
1000	1 Proz. Phenol + 0,04 n HCl	0,955	4,5

Aus diesen Tabellen sehen wir, daß nach Behandlung von 50 ccm Harn mit 100 mg Kohle noch kein Zuckerverlust gefunden wurde. Das Filtrat war sehr schwach gelb gefärbt und gut polarisierbar. Mit 500 mg Kohle war das Filtrat ganz farblos; jedoch waren 3,5 Proz. Glucose durch Adsorption verloren gegangen.

In einigen Fällen kam es vor, daß bei der Behandlung des Harns mit sehr wenig Kohle das Filtrat immer eine Spur des Adsorbens suspendiert enthielt. Weiter sehen wir, daß Phenol im Harn fast gar keinen Einfluß auf die Adsorption des Zuckers hat. Die anderen Substanzen, welche durch Kohle aus dem Harn entfernt wurden, sind also viel stärker adsorbierbar als das Phenol.

In der folgenden Tabelle sind einige Resultate angegeben, erhalten mit einem Harn mit 0,2 Proz. Glucose.

50 ccm Harn mit 0,2 Proz. Glucose mit Norit.

Menge Norit mg	Zusatz	Zuckergehalt des Filtrats Proz.	Zuckerverlust der anwesenden Menge Proz.
50	—	0,200	0,0
100	—	0,198	1
250	—	0,192	4
500	—	0,184	8
1000	—	0,175	12,5
1000	1 Proz. Phenol	0,189	5

Zusammenfassend können wir sagen, daß die verschiedenen Zuckerarten merkbar von Kohle adsorbiert werden.

Wenn eine Flüssigkeit jedoch zudem sehr stark adsorbierbare gefärbte Substanzen enthält, so kann man die Lösungen praktisch vollständig mit Kohle entfärben, ohne daß Zuckerverlust auftritt. Eine Anwendung davon ist gemacht worden beim Entfärben von Harn. Wenn man nicht mehr Kohle hinzufügt als nötig ist zur Erhaltung von einem nur sehr schwach gefärbten Filtrat, so enthält das letztere quantitativ alle Glucose.

Über die Vorgänge bei der Muskelermüdung.

Von

Otto Meyerhof und **K. Lohmann.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 25. November 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Inhaltsübersicht.

Wenn auch die chemischen Vorgänge, die sich bei der Arbeit und oxydativen Restitution im Muskel abspielen, in ihrem Zusammenhang mit der Wärmebildung und ihrer Bedeutung für die Arbeitsleistung einigermaßen klargestellt sind, so herrscht noch völliges Dunkel über die physikalisch-chemischen Zustandsänderungen, die im Muskel eintreten sowohl bei dem eigentlichen Akt der Kontraktion und Erschlaffung als auch bei der gesamten Ermüdung des Muskels, die schließlich unter anaeroben Bedingungen zur Aufhebung der Erregbarkeit führt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit dem letzteren Problem, das natürlich leichter mit chemischen und

physikalisch-chemischen Mitteln zu erforschen ist, während das, was sich bei der rasch vorübergehenden Verkürzung abspielt, nur auf indirektem Wege erschlossen werden kann.

Bereits früher ist gezeigt worden, daß die Ermüdung ursächlich mit der Anhäufung der Milchsäure im Innern des Muskels verknüpft ist. Zieht man nämlich einen Teil der Säure durch eine geeignete Suspensionslösung, am besten Ringerlösung mit hohem Bicarbonatgehalt (0,2 Proz.), aus dem Muskel heraus, so wächst nicht nur die Menge der anaerob gebildeten Milchsäure, sondern auch die Gesamtspannungsleistung des Muskels[1]). Nun ist aber das Ermüdungsmaximum der Milchsäure, dessen Vorhandensein zuerst die englischen Forscher *Fletcher* und *Hopkins* nachwiesen, keineswegs konstant, sondern es variiert sehr stark mit der Art der Muskelreizung, der Temperatur, Belastung des Muskels, der Jahreszeit und dem Ernährungszustand der Frösche[2]).

Wir legten uns daher folgende Fragen vor: Hängt das Ermüdungsmaximum direkt von der durch die Anhäufung der Milchsäure erreichten Wasserstoffzahl ab? Wie groß ist die Pufferkapazität der Muskelsubstanz, und schwankt diese entsprechend den Änderungen des Ermüdungsmaximums? Wird die zunehmende Säuerung des ermüdeten Muskels eindeutig durch die Milchsäure hervorgerufen, indem sie übereinstimmt mit der Acidität der ruhenden Muskulatur, zu der die gleiche Menge Milchsäure von außen zugefügt worden ist? Schließlich: Welchen Anteil hat an der Pufferung im Muskel das Eiweiß, welchen das Phosphat oder andere Puffersubstanzen? Im ersten Teil der Arbeit werden die vorstehend gestellten Fragen behandelt. Im Anschluß daran werden einzelne die Kontraktion selbst betreffende Punkte untersucht. Von der Beantwortung der genannten Fragen muß auch auf diese Vorgänge einiges Licht fallen. Wenn insbesondere die Wasserstoffzahl des Muskels eindeutig durch die gebildete Milchsäure bestimmt wird, so folgt daraus, daß die Bildung anderer Stoffe (z. B. die Abspaltung von anorganischem Phosphat aus Phosphorsäureestern) die Änderung der H-Ionenkonzentration nicht erklären kann, ferner auch, daß bei der Ermüdung keine speziellen, die Milchsäure neutralisierenden Substanzen neu entstehen. Es sei in diesem Zusammenhang besonders auf die Arbeit des australischen Biologen *Tiegs* hingewiesen[3]), der die Annahme experimentell bewiesen zu haben glaubt, daß bei der Muskelarbeit nicht nur Säure, sondern auch Alkali frei wird, das den Er-

---

[1]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **191**, 128, 1921; *K. Matsuoka*, ebendaselbst **202**, 573, 1924.

[2]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. 182, 232, 1920.

[3]) Australian Journ. of exper. Biol. and Medic. Science **2**, 1, 1925.

schlaffungsvorgang durch Neutralisation verursacht. Ja, er meint, dieses Alkali in einer stärker basischen Form des Kreatins gefunden zu haben.

I. Wasserstoffzahl des ruhenden, ermüdeten und starren Muskels und Milchsäurekonzentration.

Obgleich die Tatsache, daß der ermüdete Muskel saurer ist als der ruhende, schon nahezu ein Jahrhundert lang bekannt ist, herrscht über den Umfang der Verschiebung der Reaktion eine ziemliche Unsicherheit. Dies rührt daher, daß die Methoden, mit denen diese Verschiebung bestimmt wurde, zu manchen Bedenken Anlaß geben. Es ist seit *Fletcher* und *Hopkins* bekannt, daß die Abtötung der Muskulatur, wenn sie nicht mit bestimmten Kautelen vorgenommen wird, selbst zur Milchsäurebildung Anlaß gibt. Die Abtötung des Muskels in kochendem Wasser, wie sie von verschiedenen Autoren zur Bestimmung der Wasserstoffzahl angewandt worden ist[1]), vermeidet diese Fehlerquelle nur unvollkommen. Ferner wird beim Kochen das Bicarbonat in Na_2CO_3 und CO_2 zerlegt, was allerdings nur für den unermüdeten Muskel von Bedeutung ist (da der isolierte ermüdete Muskel nahezu kein Bicarbonat besitzt), und das entstehende Eiweißgerinnsel schließt Milchsäure ein, was wesentlich für den ermüdeten Muskel in Betracht kommt. Beim Abkochen der ganzen Schenkel kommt der weitere Fehler hinzu, daß in etwas saurerem Milieu das Calciumcarbonat und -phosphat des Knochens angegriffen wird, so daß auf diese Weise die Wasserstoffionenkonzentration zu klein gefunden wird, wovon wir uns bei Nachprüfung der Methoden überzeugten. Tötet man andererseits den Muskel nach der Vorschrift von *Fletcher* und *Hopkins* in eisgekühltem 96proz. Alkohol, extrahiert hiermit und bestimmt das p_H im eingedampften, mit Wasser aufgenommenen Rückstand des Alkohols[2]), so vermeidet man zwar diese Fehlerquellen außer der Zerlegung des Bicarbonats und erhält auch unter sich vergleichbare Resultate. Trotzdem ist diese Methode aber nicht einwandfrei und gibt für den ermüdeten und starren Muskel zu saure Werte. Im extremen Falle fanden wir beim maximal ermüdeten Muskel so ein p_H von 5,25, während man mit einwandfreier Methodik nicht unter p_H 6,2 gelangt. Es liegt dies daran, daß von den bei dieser Reaktion vorhandenen Phosphaten KH_2PO_4 und K_2HPO_4 das einbasische in 96proz. Alkohol viel leichter löslich ist. Das Verhältnis, in dem die Phosphate in den Alkohol übergehen, entspricht daher nicht dem im Muskel ursprünglich vorhandenen. Diese Fehlerquelle läßt sich dadurch vermeiden, daß man zwar die Muskulatur in 96proz. Alkohol zerreibt,

---

[1]) *Pechstein*, diese Zeitschr. **68**, 1914.

[2]) *Parnas* und *Laska-Mintz*, ebendaselbst **116**, 59, 1921.

dann aber sogleich mit demselben Volumen Wasser verdünnt und jetzt weiter mit 50proz. Alkohol extrahiert. In diesem ist nämlich auch das zweibasische Phosphat genügend löslich, so daß die im Rückstand dieses Extraktes gefundene Wasserstoffzahl wenigstens für den ermüdeten Muskel ziemlich richtige Werte ergeben dürfte. Es erscheint jedoch erwünscht, diese zu vergleichen mit solchen, die man ohne Extraktion erhält. Auch durch Zerreiben des Muskels in eisgekühlter, gesättigter NaCl-Lösung wird die Milchsäurebildung sofort zum Stehen gebracht. Nutscht man nach längerem Stehen die Kochsalzlösung ab, so kann man entweder direkt oder nach Verdünnen mit Wasser die H-Ionenkonzentration messen. Berücksichtigt man den Salzfehler der Indikatoren, so erhält man z. B. mit den einfarbigen Indikatoren von *Michaelis*[1]) p_H-Werte, die auf 0,1 reproduzierbar sind. Bei Messungen mit der Gaskette ist aber auch eine Korrektur für den Einfluß der Kochsalzlösung auf das Elektrodenpotential erforderlich, und obendrein verschiebt sich durch konzentrierte Salzlösung die Wasserstoffzahl eingestellter Pufferlösungen, so daß die Werte auch hier korrigiert werden müssen. Um diese Fehler zu vermeiden, lag es nahe, die Muskulatur unter sehr guter Eiskühlung in destilliertem Wasser mit Sand zu zerreiben und nach Abzentrifugieren des Gewebes die p_H-Messung mit der Chinhydronelektrode von *Biilmann* auszuführen[2]), die ein schnelleres Arbeiten als die Wasserstoffelektrode gestattet. In der Tat betrug die Milchsäurezunahme bis zur Messung nur 0,02 Proz., was in der Nähe des Neutralpunktes einer p_H-Verschiebung von 0,05 entspricht, eine Differenz, die völlig in die Schwankungsbreite der Versuche fällt. Beim Zerreiben ermüdeter und starrer Muskeln findet keine Milchsäureneubildung mehr statt. Allerdings kann nach *Kolthoff*[3]) der Eiweißgehalt der Lösung zu Fehlern führen, indem dadurch die Wasserstoffzahl ein wenig zu sauer gefunden wird, zumal bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion. Indes ergaben die nur wenig Eiweiß enthaltenden Muskelextrakte bei Verwendung von Goldelektroden in dem Bereich von p_H 7,2 bis 5,8 eine genügende Übereinstimmung mit der Wasserstoffelektrode. Die Abweichungen der Chinhydronelektrode im Betrage von p_H 0,02 bis 0,12 lagen meist nach der alkalischen Seite.

In der folgenden Übersicht geben wir zunächst den Vergleich der mit der Gaskette und Chinhydronelektrode gefundenen Werte, die wir für Muskeln in der Ruhe, bei kompletter Ermüdung und in Chloro-

---

1) *Michaelis* und *Gyemant*, diese Zeitschr. **109**, 165, 1920.

2) *E. Biilmann*, Ann. d. Chim. (9) **15**, 109; **16**, 321; **19**, 137, 1921 bis 1923; *Mislowitzer*, diese Zeitschr. **159**, 72, 1925.

3) Zeitschr. f. physiol. Chem. **144**, 259, 1925.

formstarre nach Zerkleinerung festgestellt haben, ebenso bei zerkleinerter ruhender Muskulatur mit Milchsäurezusatz. Der vorletzte der in der Tabelle aufgeführten Werte gibt eine ungewöhnlich geringe Acidität bei der Chloroformstarre.

Tabelle I.

Vergleich der p_H-Werte im Wasserextrakt der Muskulatur, gemessen mit der Wasserstoffelektrode und der Chinhydronelektrode.

Nr.	Datum	Froschart	Behandlung der Muskeln	p_H Wasserstoffelektrode	p_H Chinhydronelektrode	Differenz
1	21. VII.	Esc.	Ruhe	7,13	7,11	—0,02
2	18. VII.	Esc.	Ermüdet	6,19	6,31	+ 0,12
3	21. VII.	Esc.	Ruhe u. 0,45 Proz. Milchsäurezusatz	5,51	5,58	+ 0,07
4	20. VII.	Tempor. (Winterfrosch)	Chloroformstarre	6,33	6,39	+ 0,06
5	20. VII.	Esc.	Chloroformstarre	5,97	6,09	+ 0,12
6	22. VII.	Esc.	Zerkleinerte Muskulatur (0,30 Proz. Milchsäure)	6,54	6,61	+ 0,07
7	1. VIII.	Esc.	Chloroformstarre	6,86	6,93	+ 0,07
8	13. X.	Esc.	Chloroformstarre	5,98	6,03	+ 0,05

Weiterhin seien zunächst die nach den oben beschriebenen Methoden mit der Gaskette ausgeführten Versuche angegeben, die wir in der ersten Zeit vor Verwendung der Chinhydronelektrode ausführten. Es sind hier nur die Mittelwerte verzeichnet, da die Werte nach der obigen Erörterung nicht als absolut gültig angesehen werden können. Wohl aber sind die nach derselben Verarbeitungsart gemessenen Zahlen unter sich vergleichbar.

Die in Klammern beigefügten Zahlen geben die Anzahl der Versuche an. Zwischen Temporarien und Esculenten ergaben sich keine deutlichen Unterschiede.

Tabelle II.

Übersicht über die p_H-Werte (mit der H-Elektrode).

Froschkategorie	Vorbehandlung der Muskeln	NaCl-extraktion	Alkohol-extraktion	Wasser-extraktion	Milchsäuregehalt Proz.
Herbstfrösche	Ruhewert	7,02 (5)	7,74 (4)	6,75 (2)	0,03—0,07
„	Total ermüdet	5,82 (2)	5,77 (5)	6,08 (3)	0,41—0,46
„	Chloroformstarre	6,06 (1)	5,73 (2)	—	0,61—0,64
Hungerfrösche	Ruhewert	6,95 (6)	7,43 (7)	—	0,01—0,02
„	Total ermüdet	6,44 (3)	6,12 (2)	—	0,16—0,34
„	Chloroformstarre	—	—	6,23 (3)	0,30

Zum Unterschied von den Ergebnissen mit der Wasserstoffelektrode dürften die mit der Chinhydronelektrode gefundenen Wasserstoffzahlen wirklich für die wässerige Flüssigkeit im Muskel für den jeweiligen Zustand desselben zutreffen. Um die geeignete Methode zur Bestimmung des p_H hier auszuprobieren, haben wir zunächst in verschiedenen Lösungen zerquetschte Muskulatur verschiedene Zeit lang unter Eiskühlung geschüttelt, ehe Chinhydron zugesetzt und gemessen wurde. Es ergab sich hierbei, daß, wenn die Milchsäure im Innern des Muskels entstanden ist, nach dem Zerdrücken des Gewebes die Suspensionslösung sofort nahezu die endgültige Wasserstoffzahl anzeigt. Bei Ruhemuskeln erfolgt in destilliertem Wasser wie in Ringerlösung selbst unter Eiskühlung mit der Zeit eine geringfügige Verschiebung nach der sauren Seite, die auf langsam fortschreitende Milchsäurebildung zu beziehen ist. So änderte sich z. B. das p_H in destilliertem Wasser in 30 Minuten von p_H 7,13 auf p_H 7,08, in 60 Minuten von p_H 7,44 auf 7,23, bei in Ringerlösung zerquetschten Muskeln in 30 Minuten von p_H 7,0 auf p_H 6,91. Dagegen ist der p_H-Wert bei in gesättigter NaCl-Lösung zerriebener Muskulatur auch hier sofort konstant, aber ebenfalls wie bei der Messung mit der Wasserstoffelektrode zu sauer (z. B. statt p_H 7,44 in destilliertem Wasser, nur 7,04). Wurde dagegen Milchsäure von außen zugesetzt, so mußte über eine halbe Stunde geschüttelt werden, damit ein vollständiger Ausgleich eintrat. Für die in der folgenden Tabelle aufgeführten Bestimmungen wurde die Muskulatur 5 bis 10 Minuten unter guter Eiskühlung in destilliertem Wasser zerrieben und dann Chinhydron zugefügt. Unter diesen Umständen ist der Milchsäuregehalt etwa 0,02 Proz. höher als bei direkter Verarbeitung der eisgekühlten Muskeln in Salzsäure. In einem größeren Teil der Versuche wurde bei einer weiteren Portion der Muskeln nach 45 Minuten langem Schütteln nochmals die c_H bestimmt, die, wie man sieht, nahezu gleich geblieben ist. In der Tabelle III sind Versuche mit Sommer- und Herbstfröschen in der Ruhe, nach Ermüdung und in Chloroformstarre ausgeführt, wobei zum Teil die Milchsäure gleichzeitig bestimmt ist.

Die Tabelle zeigt, daß zwar kein vollständiger, aber doch ein weitgehender Parallelismus zwischen Milchsäuregehalt und Wasserstoffzahl besteht. Die c_H ist bei der Ermüdung und ebenso bei der Starre im Herbst größer als im Sommer und stuft sich recht gut nach dem Milchsäuregehalt ab. Es werden nicht so saure Werte erreicht, wie bei den anderen Verarbeitungsarten. Es ergibt sich als Durchschnitt für Herbstfrösche in der Ruhe p_H 7,3, in der Ermüdung (0,4 bis 0,45 Proz. Milchsäure) p_H 6,4, in der Chloroformstarre (0,5 bis 0,6 Proz. Milchsäure) p_H 6,0. Das Ruheminimum bei den im Freien gehaltenen Fröschen lag ganz erheblich höher, als es sonst bei den in Kellerräumen unter-

Tabelle III.

p_H-Werte im Muskelauszug, gemessen mit der Chinhydronelektrode.

Nr.	Datum	Froschart	Vorbehandlung der Muskeln	Verarbeitungsart	Zeit nach Zerreiben	p_H	Milchsäure Proz.
1	6. VII.	Esc. Sommerfrösche	Ruhe	Destilliert. Wasser	5'	7,13	nicht bestimmt
2	16. VII.	Esc. Sommerfrösche	„	Destilliert. Wasser	5	7,44	nicht bestimmt
3	16. VII.	Esc. Sommerfrösche	„	Ringerlösung	7	7,01	nicht bestimmt
4	16. VII.	Esc. Sommerfrösche	„	Ringerlösung	3	7,07	nicht bestimmt
5	17. VII.	Esc. Sommerfrösche	„	Ringerlösung + Sand	0	7,01	nicht bestimmt
					60	6,99	
6	31. VII.	Tempor. Winterfrosch*)	Ermüdung	Destilliertes Wasser	0	7,34	0,092
					45	7,30	
7	31. VII.	Esc. Sommerfrösche	„	Destilliertes Wasser	0	6,68	0,28
					45	6,65	
8	31. VII.	Esc. Sommerfrösche	„	Destilliertes Wasser	0	6,74	0,24
					45	6,72	
9	31. VII.	Esc. Sommerfrösche	„	Destilliertes Wasser	0	6,94	0,23
					45	6,87	
10	20. VII.	Esc. Sommerfrösche	Chloroformstarre	Destilliertes Wasser	0	6,09	—
11	20. VII.	Tempor. Winterfrosch*)	„	Destilliertes Wasser	0	6,39	—
12	14. X.	Esc. Herbstfrösche	Ruhe	Destilliertes Wasser	0	7,30	—
13	15. X.	Esc. Herbstfrösche	„	Destilliertes Wasser	0	7,38	—
14	15. X.	Esc. Herbstfrösche	„	Destilliertes Wasser	0	7,27	—
15	14. X.	Esc. Herbstfrösche	Ermüdung	Destilliertes Wasser	0	6,62	0,364
16	15. X.	Esc. Herbstfrösche	„	Destilliertes Wasser	0	6,41	0,450
17	16. X.	Esc. Herbstfrösche	„	Destilliertes Wasser	0	6,34	0,417
18	13. X.	Esc. Herbstfrösche	Chloroformstarre (unvollständig)	Destilliertes Wasser	0	6,63	0,303
19	13. X.	Esc. Herbstfrösche	Chloroformstarre	Destilliertes Wasser	0	6,03	0,393
20	15. X.	Esc. Herbstfrösche	„	Destilliertes Wasser	0	6,06	0,570
21	16. X.	Esc. Herbstfrösche	„	Destilliertes Wasser	0	5,87	0,500

*) Seit dem Winter im Keller hungernd.

gebrachten Tieren gefunden wird. Dies „physiologische“ Minimum ist bei Sommer- und Herbstfröschen 0,02 bis 0,03 Proz. Dagegen betrug das Milchsäureminimum bei den Fröschen, die im Garten in offenen Froschbassins gehalten waren, 0,05 bis 0,08 Proz. Dieser Wert ging bei zweitägigem Aufenthalt der Frösche im Eisschrank auf 0,03 Proz. herab. Reizt man die Froschschenkel durch Einzelinduktionsschläge oder kurze Tetani in Intervallen von 15 bis 20 Sekunden statt wie in früheren Versuchen des einen von uns in Intervallen von nur 3 Sekunden, so erzielt man ein erheblich höheres anaerobes Milchsäuremaximum, zumal wenn nach beendigter indirekter Reizung die Muskeln direkt ermüdet werden, wobei allerdings ihre Erholungsfähigkeit vernichtet wird und die Muskeln starr werden. An unabgehäuteten Schenkeln

frisch gefangener Herbstfrösche kommt man so zu einem Ermüdungsmaximum bis 0,6 Proz. Im allgemeinen betrug es für die Herbstfrösche 0,45 Proz. Milchsäure. Der höchste beobachtete Wert der Chloroformstarre war 0,85 Proz. Aus Wärmeversuchen von *Hartree* und *Hill*[1]) folgt, daß es ihnen ebenfalls gelang, in der Coffeinstarre bis zu etwa 0,9 Proz. Milchsäure zu erzielen. Der durchschnittliche Starrewert bei den Herbstfröschen war 0,6 bis 0,65 Proz. Bei gleicher Behandlung lag das Ruheminimum der Hungerfrösche, die im Herbst gefangen waren, im Frühjahr bei 0,01 bis 0,02 Proz., das Ermüdungsmaximum zwischen 0,16 bis 0,30 Proz., das Maximum der Chloroformstarre bei 0,3 Proz. Diese Werte ändern sich also parallel. Auch sieht man aus der obigen Zusammenstellung, daß die p_H-Werte bei Ermüdung und Starre in den Muskeln der Hungerfrösche weniger abnehmen als bei den Herbstfröschen.

In einer größeren Zahl von Versuchen wurde zu der Suspension der unermüdeten Muskulatur Milchsäure in demselben Betrage zugefügt, wie er sich bei den gleichzeitigen Ermüdungs- und Starreversuchen durch die Behandlung des Muskels ergab. Es wurde dann stets ein Schenkel unter Eiskühlung abpräpariert, während der andere Schenkel ermüdet oder in Starre versetzt wurde. Die Muskulatur des ersteren wurde in Alkohol oder gesättigter NaCl-Lösung zerrieben für Messungen mit der Wasserstoffelektrode oder in destilliertem Wasser für die Chinhydronelektrode. Es wurde so viel Milchsäure zugesetzt, daß der Gehalt dem entsprach, den man nach der Behandlung im anderen erwarten konnte. Allerdings gelang dies nicht immer genau, wie die spätere Milchsäurebestimmung zeigte. Der zweite Schenkel wurde genau wie der erste verarbeitet, doch blieb ein Teil für die chemische Bestimmung der Milchsäure zurück. Zu dem angegebenen „Milchsäurezusatz zur Ruhemuskulatur" müssen noch durchschnittlich 0,03 Proz. für den Anfangswert hinzuaddiert werden, da es sich in den Versuchen um Herbstfrösche handelte. Die Tabelle IV zeigt, daß bei derselben Verarbeitungsart die spontane Milchsäurebildung die gleiche Verschiebung des p_H verursacht, wie sie durch Zusatz der betreffenden Milchsäuremenge zu ruhender Muskulatur hervorgerufen wird. Nach keiner Seite bestehen systematische Abweichungen[2]).

[1]) Journ. of Physiol. 58, 441. 1924.

[2]) Wie Herr Professor *A. V. Hill* in London uns brieflich mitteilt, hat in seinem Laboratorium unabhängig von uns Mrs. *P. T. Kerridge* ähnlich angelegte Versuche mit der *Haber*schen Glaselektrode ausgeführt, die ebenso wie die unseren das Resultat ergaben, daß zur ruhenden Muskulatur zugesetzte Milchsäure die Wasserstoffzahl etwa ebenso verschiebt, wie die gleiche Menge der bei der Ermüdung gebildeten. Siehe auch *P. T. Kerridge*, Biochem. Journ. 19, 611, 1925.

Tabelle IV.

Vergleich der Säuerung durch die im Muskel gebildete und von außen zugesetzte Milchsäure.

Nr.	Froschart	Messung	Ruhemuskeln			Vorbehandelte Muskeln		
			Milchsäurezusatz Proz.	Extraktionsmethode	p_H	Behandlung der Schenkel	Milchsäure gebildet Proz.	p_H
1	Esc.	H-Elektrode	0,45	NaCl	5,6	Unvollständig ermüdet	(ca. 0,4)	5,9
2	„	„	0,45	Alkohol	6,0	Total ermüdet	0,456	5,8
3	„	„	0,42	„	5,95	Chloroformstarre	0,614	5,56
4	Temp.	„	0,40	„	6,05	Total ermüdet	0,415	5,9
5	Esc.	„	0,57	Alkohol 5 Stunden geschüttelt	5,86	Chloroformstarre	0,64	5,89
				Alkohol 22 Stunden geschüttelt	5,82			
6	Esc.	Chin. Elektrode	0,57	Destilliert. Wasser, 90′ geschüttelt	5,82	Chloroformstarre	0,500	5,87
7	„	„	0,395	Destilliert. Wasser, 90′ geschüttelt	6,22	Ermüdung	0,417	6,34

Frisch gefangene Herbstfrösche und solche, die etwa 6 bis 8 Monate gehungert haben, zeigen, wie aus der obigen Tabelle II hervorgeht, ein sehr verschiedenes Verhalten: Bei den ersteren hohe Pufferkapazität der Muskulatur und dementsprechend hohe Milchsäurewerte, bei den letzteren verringerte Pufferkapazität und verringerte Milchsäurewerte. Um die Pufferkapazität in den Muskeln von Hungerfröschen genauer zu bestimmen, wurde zu diesen ebenfalls 0,3 bis 0,45 Proz. Milchsäure zugesetzt. Es ergaben sich bei Verarbeitung in 96proz. Alkohol, gemessen mit der H-Elektrode, die folgenden Werte:

0,4proz. Milchsäure (drei Versuche) . . . . . p_H 5,60
0,45 „ „ (sieben Versuche) . . . . p_H 4,94

Die Reaktion ist also erheblich saurer als bei gleichem Milchsäurezusatz zu Muskeln der Herbstfrösche. Die Winterfrösche erreichen daher bei der Ermüdung zwar eine geringere Wasserstoffzahl, besitzen aber auch eine geringere Pufferkapazität als die Herbstfrösche. Beide Faktoren wirken bei dem Herabgehen des Milchsäuremaximums zusammen.

Methodische Bemerkungen.

Präparation und Reizung der Frösche geschah wie in früheren Versuchen. Zur Reizung bedienten wir uns einer *Bowditch*-Uhr (von Zimmermann, Leipzig), die mit Abblender für die Schließungsschläge in den Primärkreis geschaltet wurde. Die Verarbeitung der Muskeln auf Milchsäure

geschah, wie kürzlich beschrieben[1]), mittels Enteiweißung nach *Schenck*[2]) und nachherigem Zusatz von Kupfersulfat und Calciumhydroxyd nach *van Slyke* und *Clausen*[3]). Der Gesamtverlust an Milchsäure in dieser Anordnung betrug bei unseren Mengenverhältnissen (2 bis 0,5 mg) 3 bis 8 Proz.[4]).

---

[1]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **204**, 295, 1924.

[2]) Versuche, diese Enteiweißung durch das Verfahren von *Folin-Wu* zu ersetzen (Natrium-Wolframat in schwach saurer Lösung), ergaben, daß ein unmittelbarer Zusatz des Wolframats zu in Salzsäure zerriebener Muskulatur zu Fehlern führt. Wohl aber ist es möglich, die in Säure gequollene Muskulatur nach mehrstündigem Stehen durch scharfes Zentrifugieren niederzuschlagen und die abgegossene Lösung durch einen passenden Zusatz von Natrium-Wolframat zu enteiweißen. Hieran läßt sich direkt das Kupfer-Kalkverfahren anschließen. Die auf diesem Wege gefundenen Resultate stimmten mit den nach *Schenck*-Enteiweißung genau überein. Das Verfahren hat den Vorteil, den Schwefelwasserstoff entbehrlich zu machen. Dagegen wird so nur ein verhältnismäßig kleiner Teil des ursprünglichen Volumens für die Milchsäurebestimmung wiedergewonnen, so daß es nur bei größerem Milchsäuregehalt der Muskulatur in Frage kommt.

[3]) Journ. of biol. Chem. **52**, 263, 1922.

[4]) Die gleiche Methodik wurde kurz danach unabhängig von *Hirsch-Kauffmann* beschrieben (Zeitschr. f. physiol. Chem. **140**, Heft 1 und 2). In der Erwiderung *Embdens* (ebendaselbst **148**, 299) auf meine diesbezügliche Reklamation befindet sich eine Stelle, die richtiggestellt werden muß. *Embden* schreibt, daß die Methode der Verarbeitung des *Schenck*-Filtrats der Muskeln von mir früher „in entschieden fehlerhafter Weise“ ohne Ätherextraktion angewandt sei. Ich habe an der von *Embden* zitierten Stelle jedoch das Gegenteil gesagt, daß nämlich diese Verarbeitungsart offenbar nur in Verbindung mit solcher Extraktion zuverlässige Werte gibt, daß ich selbst sie „probeweise“ ohne Extraktion versucht hätte, dies aber infolge von Fehlschlägen aufgegeben hätte (Pflügers Arch. **195**, 28, 1922). Diese Fehlschläge können unter anderem an dem Kohlehydratgehalt der Lösung liegen. Damit hat die Feststellung nichts zu tun, daß bei der Methode der Alkoholextraktion die aus dem Muskel in den Alkohol übergehenden Zuckerspuren keine Fehler geben. Ich finde keine Ergebnisse aus dem *Embden*schen Institut, durch welche diese Angabe erschüttert würde. Andererseits wurden direkt nach *Schenck*-Enteiweißung gelegentlich reine Ringerlösungen verarbeitet, nachdem sie zur Suspendierung unabgehäuteter Schenkel für kalorimetrische Versuche gedient hatten. Diese enthalten nur ganz geringe Mengen Eiweiß und sehr wenig Milchsäure. Erst durch die Benutzung des *van Slyke*schen Entzuckerungsverfahrens ist die von *Embden* für die Muskelmilchsäure eingeführte Methode der *Schenck*-Enteiweißung bequemer und zuverlässiger geworden als das Verfahren der Alkoholextraktion. Wieso trotz der weitgehenden Übereinstimmung mit *Hirsch-Kauffmann* sich in meinen Messungen immer ein etwa 6 Proz. größerer Verlust ergab, beruht, wie sich herausgestellt hat, auf der Benutzung von Claisenkolben statt der von diesem Autor verwandten Kjeldahlkolben. Mit den letzteren sinkt der Verlust bei sonst genau gleicher Anordnung um 6 bis 8 Proz. herab und beträgt nunmehr für Mengen von 3 bis 4 mg nur durchschnittlich noch 4 Proz. (statt früher 10 Proz.), für Mengen von $\frac{1}{2}$ mg nur noch 7,5 Proz. (statt früher 15 Proz.). Die gerade Form des Kjeldahlkolbens ist also für die Destillation besonders geeignet. (Anmerkung von *O. Meyerhof*.)

Die elektrometrische Bestimmung des p_H geschah in der Anordnung von *Michaelis*. Wir benutzten seine Birnenelektrode[1]) und als Nullinstrument ein Nadir-Zeigergalvanometer. Einige orientierende Versuche wurden auch mit der einfarbigen Indikatorenmethode von *Michaelis* angestellt. Die Bestimmung in der NaCl-Lösung und in destilliertem Wasser erfolgte nach dem Abzentrifugieren der Muskeln, die Bestimmungen im Alkoholextrakt nach Eindampfen desselben und Auffüllen mit destilliertem Wasser auf das ursprüngliche Muskelvolumen. Auch wenn Milchsäure zugesetzt wurde, wurde darauf geachtet, daß das Flüssigkeitsvolumen genau übereinstimmte mit demjenigen, in dem die ermüdete Muskulatur aufgeschwemmt war.

Als Chinhydronelektrode wurden zwei Wägegläschen benutzt, die durch einen Agarheber verbunden waren. Die Bezugselektrode war ein Acetatpuffergemisch von p_H 4,52, das täglich neu bereitet und gegen eine Kalomelelektrode eingestellt wurde. Zur Bereitung der Gewebslösung wurde etwa $\frac{1}{2}$ bis 1 g Muskulatur in der zwei- bis dreifachen Menge destillierten Wassers in einem Mörser, der sich in einer Kältemischung befand, fein zerrieben. Bei ruhender Muskulatur wurde Chinhydron vor dem Zerreiben zugesetzt. Nach dem Zerreiben wurde eine halbe Minute zentrifugiert, die wenig getrübte Flüssigkeit mit Chinhydronzusatz in dem Wägegläschen durch Einstellen in Wasser auf die Meßtemperatur gebracht. Bei Zusatz von Milchsäure wurde der Gewebsbrei in einer dicht schließenden Pulverflasche in einem größeren, mit zerstoßenem Eis gefüllten Gefäß bei hoher Tourenzahl geschüttelt.

II. Die Puffersubstanzen im Muskel.

Auf welche Bestandteile ist nun die Pufferkapazität zurückzuführen? Die Beantwortung dieser Frage ist für den Ermüdungsvorgang im Muskel von großer Bedeutung. Es ist gezeigt worden[2]), daß ein wesentlicher Teil der Wärme, der bei der Muskelkontraktion frei wird, auf die Reaktion zurückzuführen ist, die schematisch geschrieben werden kann:

$$B^{\cdot}P' + \mathrm{H}^{\cdot}L' = B^{\cdot}L' + [\mathrm{H}P].$$

(B = Basenbestandteil, P = Proteinanion, L = Milchsäureanion.)

Wenn dies zutrifft, so muß ein großer Teil des Alkalis, der im ruhenden Muskel an das Protein gebunden ist, im ermüdeten Muskel an die Milchsäure gebunden sein. Während nun das Alkaliprotein in Alkohol nicht löslich ist, ist das Alkalilactat darin löslich. Die Annahme läßt sich also leicht experimentell prüfen, indem man feststellt, ob Aschenbestandteile, entsprechend den fixen Basen, die im ruhenden Muskel alkoholunlöslich sind, im ermüdeten Muskel alkohollöslich geworden sind, und zwar in einem Betrage, der der gebildeten Milchsäure entspricht. Das Ergebnis der Versuche führt zu einer Bestätigung dieser Hypothese: Die alkohollöslichen Aschenbestandteile, die wir

[1]) Vereinigte Werkstätten für Laboratoriumbedarf.
[2]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **195**, 22, 1922; **204**, 295, 1924.

nach Abzug der Phosphorsäure zur Hauptsache auf Basen beziehen können, haben in einem Umfange zugenommen, der etwa der gebildeten Milchsäure äquivalent ist, wenn man die Basen auf Kalium berechnet.

In der Tabelle V ist eine Zusammenstellung der Resultate gegeben, die dies deutlich erkennen läßt. Die Asche ist als Sulfat bestimmt (s. S. 142) und in Prozenten des Gewichts des Trockenrückstandes des Muskels ausgedrückt.

Tabelle V.

Verteilung der Asche auf alkoholischen Extrakt und Rückstand.

Nr.	Asche im Muskelrückstand			Asche im Alkoholextrakt		
	vor Ermüdung Proz.	nach Ermüdung Proz.	Differenz Proz.	vor Ermüdung Proz.	nach Ermüdung Proz.	Differenz Proz.
1	3,87	2,07	— 1,8	—	—	—
2	3,76	2,05	— 1,71	1,44	3,46	+ 2,02
3	4,37	2,48	— 1,89	2,08	4,86	+ 2,78
4	4,56	3,52	— 1,04	3,48	4,65	— 1,17
5	4,43	3,42	— 1,01	3,57	5,14	+ 1,57

In den Versuchen sind 1,0 bis 1,8 Proz. Asche aus dem Rückstand verschwunden, während andererseits der Alkoholextrakt 1,2 bis 2,8 Proz. Asche gewonnen hat, was eine Verdopplung des Aschengehaltes bedeutet. Die absoluten Werte schwanken etwas je nach dem Wassergehalt des Alkohols, der Verarbeitungsweise usw. Zum Vergleich wurden stets symmetrische Schenkel desselben Frosches benutzt. Theoretisch sollte natürlich die Asche des alkoholischen Extrakts um denselben Betrag zunehmen, um den die Asche des Rückstandes sich verringert. Die Abweichungen zwischen den beiden Größen dürften auf das verhältnismäßig rohe Verfahren, die Asche zu bestimmen, zurückzuführen sein. Die Verschiebung des Aschengehaltes um 1 bis 2 Proz. des Trockengewichts vom alkoholischen Rückstand auf den alkoholischen Extrakt stimmt in der Größenordnung recht gut mit der gleichzeitigen Milchsäurebildung überein. Diese betrug in den Versuchen 0,35 bis 0,5 Proz. bezogen auf das Feuchtgewicht, was, bezogen auf das Gewicht des alkoholischen Rückstandes, einen Milchsäuregehalt von 1,9 bis 2,75 Proz. bedeutet. Nehmen wir an, daß die Zunahme der Asche des Extrakts auf Kaliumsulfat zu beziehen ist, so muß nach der obigen Gleichung ein Molekül K_2SO_4 zwei Molekülen Milchsäure korrespondieren. Für 180 g Milchsäure müssen also 175 g K_2SO_4 in der Asche des alkoholischen Extrakts auftreten. In der Tat sieht man, daß die Aschenzunahme des Extrakts in ihrem Gewicht annähernd so groß ist wie die Milchsäurebildung bei der Ermüdung. Es ist aber noch ein Einwand gegen diese Berechnung zu prüfen. Da,

wie oben erwähnt, das einbasische Phosphat leichter in den alkoholischen Extrakt übertritt als das zweibasische, könnte die Zunahme des Aschengehaltes des alkoholischen Extrakts beim ermüdeten Muskel auf Vermehrung der Phosphate bezogen werden. Aus diesem und anderen Gründen haben wir in mehreren Versuchen auch die Verteilung des Phosphats geprüft, und zwar zunächst auf den alkoholischen Extrakt und Rückstand, wobei der Rückstand dann noch mit heißem und kaltem Wasser erschöpft wurde.

In Versuch 4 der Tabelle V ergab sich der P_2O_5-Gehalt des alkoholischen Extraktes vor der Ermüdung zu 1,13 Proz. (bezogen auf das Gewicht des Muskelrückstandes), nach der Ermüdung zu 1,07 Proz.; im Wasserauszug des Rückstandes vor der Ermüdung zu 1,03 Proz., nach der Ermüdung zu 0,89 Proz.

Bei Wiederholung (Versuch 5 der Tabelle V) betrug der P_2O_5-Gehalt des alkoholischen Extrakts vor der Ermüdung 0,90 Proz., nach der Ermüdung 1,13 Proz., der des wässerigen Auszuges des Muskelrückstandes vor der Ermüdung 0,98 Proz., nach der Ermüdung 0,99 Proz., schließlich der Gehalt des Residuums, der weder wasser- noch alkohollöslich war, in beiden Fällen 0,08 Proz. P_2O_5.

Nach diesen Versuchen sind die Verschiebungen im Phosphatgehalt nicht ganz regelmäßig, aber in jedem Falle nicht erheblich, da sie im höchsten Falle 0,2 Proz., also nur ein Zehntel der Verschiebung der Gesamtasche ausmachen. Der Schluß ist daher berechtigt, daß dieser Übertritt der Asche aus dem Rückstand in den Extrakt ganz überwiegend darauf zurückzuführen ist, daß die Milchsäure alkoholunlösliche fixe Basen in Lösung bringt. Um festzustellen, wieviel von dieser alkoholunlöslichen Base im ruhenden Muskel an Eiweiß gebunden ist, haben wir den Muskelrückstand nach Alkoholextraktion erst mit Äther, dann mit heißem Wasser extrahiert, in jedem Anteil die Asche bestimmt und die gleiche Prozedur mit dem ermüdeten Muskel wiederholt. Sicher dürfte diejenige Asche an Eiweiß gebunden sein, die nach diesen Extraktionen im Rückstand bleibt. Allerdings ist dies ein Minimalwert, denn erstens kann trotz der vorangehenden Denaturierung mit Alkohol etwas Eiweiß in Wasser gelöst werden, und ferner kann beim Waschen mit Wasser Alkali hydrolytisch aus dem Proteinsalz abgespalten werden. In drei Versuchen haben wir diese Differenzierung der Asche vorgenommen. Der Ätherextrakt erwies sich als praktisch aschefrei und konnte vernachlässigt werden. Die Verteilung auf den wasserlöslichen und den wasserunlöslichen Teil des mit Alkohol extrahierten Rückstandes ist in der Tabelle VI gegeben. Danach ist gut die Hälfte der übertretenden Aschenbestandteile wasserlöslich, der Rest wasserunlöslich.

Tabelle VI.

Aschenverlust im wasserlöslichen und wasserunlöslichen Anteil des Muskelrückstands.

Nr.	Abnahme des Aschengehalts bei der Ermüdung	Asche, wasserlöslich			Asche, wasserunlöslich		
		vor der Ermüdung	nach der Ermüdung	Differenz	vor der Ermüdung	nach der Ermüdung	Differenz
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
3	1,89	3,12	1,95	— 1,17	1,25	0,52	— 0,73
4	1,04	3,04	2,61	— 0,43	1,53	0,91	— 0,62
5	1,01	3,27	2,73	— 0,54	1,16	0,69	— 0,47

In welchem Maße die Phosphate durch Verringerung ihrer Basenbindung bei der Ermüdung an dieser Verschiebung der Asche aus dem Alkoholextrakt in den Rückstand beteiligt sind, kann man wenigstens für *einen* Versuch annäherungsweise durchrechnen, wo wir neben der Gesamtasche in jedem Extraktanteil den Phosphatgehalt bestimmt haben. Es ist dies Versuch 5 der Tabelle VI, bei dem sich der Phosphatgehalt des alkoholunlöslichen Rückstandes bei der Ermüdung nicht wesentlich änderte.

Im ganzen fanden sich in 1,853 g Trockenrückstand 18,1 mg P_2O_5, entsprechend 25 mg Phosphorsäure. Bei der Ermüdung, 0,39 Proz. Milchsäure, verschiebt sich die Wasserstoffzahl von 7,3 auf 6,4, was eine Änderung des Verhältnisses von $\frac{K_2HPO_4}{KH_2PO_4}$ von 3 auf 0,4 zur Folge hat. Bei 98 g H_3PO_4 werden mithin 17,5 g Kalium abgegeben. Setzen wir das gesamte Phosphat, gleich 18,1 mg P_2O_5, dem anorganischen Phosphat im Basenbindungsvermögen gleich — in Wahrheit ist seine Pufferkapazität geringer —, so gibt es bei der Ermüdung 4,4 mg Kalium ab. Die Asche des Wasserauszuges in diesem Versuch hatte um 10 mg abgenommen, was, auf K_2SO_4 berechnet, gleich 4,4 mg Kalium ist. Dies entspricht also der Basenabgabe des Phosphats. Dagegen kann die gesamte Aschenabnahme des wasserunlöslichen Rückstandes auf Alkaliabgabe des Proteins bezogen werden. Es ist dies dann die Hälfte der oben berechneten, in den Alkoholextrakt übergegangenen Basenmenge. Danach kann man näherungsweise annehmen, daß die Hälfte (bis zwei Drittel) der Milchsäure sich mit Protein umsetzt und der Rest mit Phosphat. Zu einem ähnlichen Resultat gelangten die englischen Forscher *Andrews*, *Beattie* und *Milroy*[1]) am Preßsaft von Pferdemuskeln, wo sie z. B. fanden, daß die Pufferkapazität gegen 200 Proz. höher ist als der Phosphatgehalt.

Mit der Abgabe des Alkalis von seiten des Proteins muß der Lösungszustand des letzteren beeinflußt werden, indem es durch Annäherung

[1]) Biochem. Journ. 18, 993, 1924.

an den isoelektrischen Punkt instabil wird. Ja, wie früher gezeigt, ist es nicht unwahrscheinlich, daß hierbei eine Dehydratation stattfindet, die vielleicht mit positiver Wärmetönung verknüpft ist[1]). Eine solche Entquellung des Proteins im ermüdeten Muskel ist außerordentlich leicht nachweisbar. Allerdings hängt die Stabilität der Muskelproteine in der Nähe des isoelektrischen Punktes, wie kürzlich von *H. H. Weber*[2]) gezeigt wurde, von der Art und Konzentration der anwesenden Salze ab; dementsprechend ist auch der Unterschied der Quellbarkeit der unermüdeten und ermüdeten Muskelsubstanz vom Salzgehalt der Suspensionslösung abhängig. Außerordentlich groß ist er in gesättigter NaCl-Lösung. Nutscht man z. B. in solcher Lösung zeriebene Muskulatur mit der Wasserstrahlpumpe ab, so erhält man bei gleicher Ausgangsmenge aus dem ermüdeten Muskel das Mehrfache an Filtrat, noch dazu viel eiweißärmer als aus ruhender Muskulatur, die in dieser Lösung stark aufquillt. Durch bloßen Anblick der in Kochsalzlösung zerriebenen Muskulatur läßt sich entscheiden, ob der Muskel ermüdet war oder nicht. Weniger groß, aber auch noch sichtbar ist die Differenz, wenn die Muskulatur in destilliertem Wasser zerrieben wird.

Methodik der Asche- und Phosphorsäurebestimmungen.

Von zwei bis drei Fröschen wurde je ein Schenkel sofort in Alkohol zerrieben, der andere nach völliger Ermüdung in Stickstoff (indirekte Reizung mit kurzen Tetani in 15 Sekunden Intervall). Die mit der Schere fein zerkleinerte Muskulatur blieb über Nacht mit dem Alkohol stehen; sie wurde dann abgepreßt, mehrmals mit 96proz. Alkohol nachgewaschen, bei 105° getrocknet und gewogen. In mehreren Versuchen wurde der Rückstand weiter mit Äther und dann mit Wasser von 50° erschöpfend ausgezogen. Zur Bestimmung der Basenbestandteile wurden die im Trockenschrank getrockneten Extrakte und Rückstände in Porzellanschalen im Luftbad völlig verascht, durch ein aschenfreies Filter in einen Porzellantiegel filtriert, auf dem Wasserbad mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure eingedampft. Das Abrauchen der Schwefelsäure geschah unterhalb Rotglut. Nach Zusatz verdünnten Ammoniaks und Eindampfen auf dem Wasserbad wurde wieder sorgfältig unterhalb Rotglut bis zur Gewichtskonstanz geglüht. Kontrollveraschungen von Kaliumphosphat ergaben, daß der Kaliumgehalt bei den im Muskel vorhandenen Phosphatmengen unter Zugrundelegung von Kaliumsulfat für die Rechnung etwa 4 bis 5 Proz. zu groß gefunden wird, doch ist dies im vorhergehenden außer Betracht gelassen.

Die P_2O_5-Bestimmungen erfolgten nach Lösung der Asche, zum Teil auch in vor der Veraschung entnommenen aliquoten Teilen der Extrakte.

---

[1]) Doch ist es bisher mit Eiweißlösungen, im Gegensatz zu Aminosäuren, nicht gelungen, diese Wärme direkt nachzuweisen. Versuche, die der eine von uns (*O. Meyerhof*) mit *H. Blaschko* vornahm, mit Fibrinogenlösungen, Seidenpepton in Alkohol-Wassergemischen u. a. verliefen negativ.

[2]) Diese Zeitschr. 158, 443 und 473, 1925.

mit dem Strychnin-Molybdänreagens von *Pouget* und *Chouchak*[1]) gravimetrisch nach der von *Embden* angegebenen Modifikation der Methode[2]). Die Niederschläge wurden auf Filterplatten von gesintertem Glas von *Schott* (Jena) oder in Porzellanfiltertiegeln der Berliner Porzellanmanufaktur abgesaugt.

III. Über den zeitlichen Zusammenhang von Kontraktion und Milchsäurebildung.

Die energetische Rolle, die der Milchsäure bei der Kontraktion zufällt, ist in den Arbeiten des einen von uns dahin bestimmt worden, daß die Spaltung des Glykogens in Milchsäure und die hierdurch veranlaßte Entionisierung des Muskeleiweißes die Energie für die anaerobe Arbeit liefert, während die Oxydation nachträglich durch die Rückverwandlung der Milchsäure in ihre Ausgangsform Glykogen den ursprünglichen physikalisch-chemischen Zustand des Muskels wieder herstellt, wobei die Oxydationsenergie den unfreiwilligen Verlauf der Prozesse der Arbeitsphase in umgekehrter Richtung erzwingt. Bei dieser energetischen Deutung sind über den speziellen Mechanismus, insbesondere ob die Milchsäure direkt oder indirekt an dem Kontraktionsvorgang selbst beteiligt ist, keine Annahmen gemacht worden, sondern in dieser Beziehung nur eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür festgestellt, daß das Auftreten der Milchsäure, insbesondere das Entstehen von H-Ionen hierbei irgendwie ursächlich am Zustandekommen der Kontraktion beteiligt sei[3]). Bekanntlich sagt die Thermodynamik über den Mechanismus eines Vorgangs nichts aus; etwa der Umstand, daß in der Dampfmaschine die Energielieferung durch die Verbrennung von Kohle geschieht, läßt den Mechanismus unbestimmt und widerspricht nicht der anderen Tatsache, daß die Energie durch die Wärme-Ausdehnung des Wasserdampfes auf den Kolben übertragen wird. Die Einwände, die von *Embden* insbesondere in seinem Vortrag auf dem Deutschen Physiologenkongreß[4]) gegen die Vorstellungen von *Hill* und *Meyerhof* erhoben wurden und in der Diskussion zu diesem Vortrag ein lebhaftes Echo gefunden haben, scheinen in erster Linie auf solches Mißverständnis zurückzuführen zu sein. Denn seine Beobachtung, daß bei tetanischer Reizung des Muskels in über der Hälfte der Fälle die Milchsäurebildung die mechanische Zustandsänderung mehrere Sekunden überdauert[5]), würde zwar die Beteiligung der Milchsäure an dem

---

[1]) Bull. soc. chem., 4. Serie, 5, 104, 1909; 6, 649, 1911.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 113, 138, 1921.

[3]) Vgl. die letzte Zusammenfassung: *O. Meyerhof* in Springers Handb. d. Physiol. 8, 476ff., insbesondere auch S. 530.

[4]) Ber. d. ges. Physiol. 32, Heft 5 bis 6, S. 690, 1925.

[5]) Klin. Wochenschr. 3, 1393, 1924; *Embden* und *Jost*, Deutsche med. Wochenschr. 51, 636; Springers Handb. d. Physiol. 8, 401.

Mechanismus der Kontraktion sehr unwahrscheinlich machen, an der oben wiedergegebenen Erklärung der Energetik der Kontraktion aber nichts ändern. Dies könnte offenbar nur dadurch geschehen, daß man an Stelle des oben genannten einen anderen unabhängigen Prozeß feststellt, der die Energie für die anaerobe Arbeit liefert und dementsprechend auch die Rolle der Oxydation anders, als oben geschehen, bestimmt. Dies aber geschieht nicht. Indessen ist dieses Mißverständnis nicht das einzige in der Argumentation *Embdens*. Er sagt, nach seinen Versuchsergebnissen „entfällt die Möglichkeit, die gesamte im Kontraktionsaugenblick frei werdende Energie aus der exothermen Umwandlung von Kohlehydrat in Milchsäure und ihren ebenfalls exotherme Reaktionen veranlassenden Folgeerscheinungen herzuleiten". „Den chemischen Prozessen bei der Muskeltätigkeit, mögen sie oxydativer oder anaerober Natur sein, käme die Aufgabe zu, den im Kontraktionsaugenblick sich entladenden kolloidchemischen Akkumulator aufzuladen oder die Feder einer Uhr wieder aufzuziehen." *Embden* bedient sich hier der von *Hill* (Akkumulator) und von *O. Meyerhof* (Uhrfeder) eingeführten Vergleiche für den oxydativen Erholungsvorgang und dehnt sie auch auf die anaeroben Prozesse aus. Nun ist es ja niemals in Vorschlag gebracht worden, den chemischen Vorgang der Milchsäurebildung *direkt* die mechanische Arbeit leisten zu lassen. Daß hier physikalisch-chemische Energietransformationen stattfinden müssen, die man beim Aufbau der Muskelmaschine aus Kolloiden auch kolloidchemische nennen kann, ist nahezu selbstverständlich, und alle für den Mechanismus der Kontraktion diskutierten Möglichkeiten sind kolloidchemischer Natur[1]). Trotzdem aber wird man die Gleichsetzung der anaeroben und oxydativen chemischen Vorgänge in ihrer Bedeutung für die Kontraktion kaum akzeptieren können, insbesondere, daß die erst nach Ablauf der Kontraktion erfolgende Milchsäurebildung ebenso die Feder für die nächstfolgenden Kontraktionen aufzieht, wie es nach der oben wiedergegebenen Theorie der oxydative Restitutionsprozeß tut. Denn dieser tut es *durch die Entfernung der Milchsäure*. Um dem klaren Widerspruch zu entgehen, daß *das Auftreten der Milchsäure* dieselbe Bedeutung hätte wie die *Entfernung der Milchsäure*, bedürfte es ad hoc erfundener komplizierter Hilfshypothesen, die man ohne Not nicht aufstellen wird.

Über die Erfordernisse der Thermodynamik hinaus ist allerdings die Hypothese erwogen, daß die Milchsäure am Mechanismus der Kontraktion teil hätte und dann auch während der Kontraktion frei werden müßte. Diese übrigens schon alte, von vielen Muskelphysiologen vertretene Annahme ließ sich durch Vergleich der chemischen und

---

[1]) Siehe Handb. d. Physiol. 8, 536.

kalorimetrischen Messungen *O. Meyerhofs* und der myothermischen von *Hartree* und *Hill* stützen. Denn die Spaltungswärme des Glykogens und die Entionisierungswärme des Muskelproteins betragen zusammen pro 1 g Milchsäure gut 300 Kalorien und decken damit etwa 80 Proz. der gesamten Wärme, die bei der anaeroben Arbeit frei wird. Von dieser wissen wir aber aus den Messungen von *Hill* und *Hartree*[1]), daß sie zum mindesten zu 80 Proz. synchron mit dem Kontraktionsvorgang entsteht, und zwar teils bei der Anspannung, teils bei der Erschlaffung. Höchstens 20 Proz. folgen nach mehreren Minuten als „anaerobe Restitutionswärme", deren Natur bisher noch nicht geklärt ist[2]). Es ist mithin außerhalb des Zeitpunktes des mechanischen Prozesses kein Platz zur Unterbringung der mit dem Milchsäureumsatz verknüpften Wärme. Daß diese aber im erschlafften Muskel durch negative Wärmetönungen aus unbekannten Reaktionen genau kompensiert würde, muß als außerordentlich unwahrscheinlich bezeichnet werden. Eine derartige Annahme scheint aber von *Embden* gemacht zu werden, wenn er aus seinen Versuchen die Möglichkeit ableitet, daß „vielleicht der Gesamtbetrag der mechanischen Arbeitsleistung nicht auf Kosten von im Kontraktionsaugenblick sich abspielender chemischer, sondern exotherm verlaufender, kolloidchemischer Prozesse sich vollzieht"[3]).

Die *Embden*schen Versuche, die diesen Annahmen zugrunde liegen, sind im einzelnen bisher nicht publiziert worden. Wie sich aus verschiedenen Angaben ergibt, sind die Gastrocnemien und Semimembranosi, die sich in Sauerstoff oder Wasserstoff befanden, direkt faradisch (bei Rollenabstand 0 cm), 5 bis 10 Sekunden gereizt worden, die Muskeln der einen Seite sofort, die anderen 10 bis 30 Sekunden später in flüssiger Luft gefroren und auf Milchsäure verarbeitet. In der Mehrzahl der Versuche war der Milchsäuregehalt der später gefrorenen größer, nur in einem Falle kleiner, in den übrigen gleich. In zwei veröffentlichten Tabellen ist bis zu 0,025 Proz. Milchsäurenachbildung verzeichnet (bezogen auf das Muskelgewicht), während die im Tetanus gebildete Milchsäure einschließlich eines Ruhewertes zwischen 0,01 und 0,02 Proz. 0,028 bis 0,078 Proz. betrug. Welches die Ursache der Schwankungen, sowohl für den Umfang der tetanischen Milchsäurebildung selbst, als auch für die Nachbildung derselben ist, wird nicht angegeben.

---

1) Journ. of Physiol. 54, 84, 1920; 56, 367, 1922; s. auch *Hill*, Ergebn. d. Physiol. 22, 322, 1923.

2) Nach einer privaten Mitteilung von Herrn *A. V. Hill* ergibt sich in neueren Versuchen von *Hartree* und *Furusawa* mit verbesserter Methodik die anaerobe Restitutionswärme noch beträchtlich kleiner als in den früheren Arbeiten. S. auch *Furusawa* und *Hartree*, Pflügers Archiv 211, 644, 1926.

3) Deutsch. med. Wochenschr. 1925, S. 636.

Da uns das Resultat *Embdens*, wonach häufig, aber nicht immer, die Milchsäurebildung die Kontraktion beträchtlich überdaure, unwahrscheinlich erschien, und auf Grund der obigen Argumente jedenfalls die Vorstellung vom Mechanismus der Muskelkontraktion außerordentlich kompliziert haben würde, so sind wir schon im Herbst 1924 in eine Nachprüfung der Ergebnisse eingetreten und haben unsere Resultate im Herbst 1925 bestätigt und erweitert[1]).

Als Methode zur Abtötung der Muskeln haben wir nach dem Vorgang *Embdens* fast stets flüssige Luft benutzt. Allerdings verhindert ja auch hier das *Leidenfrost*sche Phänomen ein sofortiges Gefrieren der Muskeln, und vergleichende Versuche mit unterkühlter Salzsäure zeigten sogar, daß beim Gefrieren in flüssiger Luft der Ruhewert ein klein wenig höher liegt, offenbar infolge der bei der Kälteeinwirkung erfolgenden Reizung. Andererseits sind aber bei gleichmäßigem Vorgehen die durch das Gefrieren in flüssiger Luft erhaltenen Resultate unter sich am besten vergleichbar. Während wir im einzelnen die Versuche variierten, insbesondere die Reizart und -dauer, die Kontraktionsform, die Temperatur und die Restitutionszeit, wurden zur Hauptsache zwei Versuchsanordnungen benutzt.

Gemeinsam war beiden, daß ausschließlich die Gastrocnemien großer Eskulenten (frisch gefangener Herbstfrösche) verwandt wurden (meist drei Paar), die stets einige Zeit vor dem Versuch in Stickstoff aufbewahrt waren, aber sich während des Versuchs selbst in Luft befanden. In einem Teil der Versuche, wo die Muskeln nur indirekt gereizt wurden und sich unbelastet kontrahierten, hingen sie an den Nervi ischiadici frei herunter, während die Beckenknochen auf einer Unterlage befestigt waren. Im Moment des Reizendes wurden die Nerven der einen Seite durch Scherenschlag durchschnitten, so daß die Muskeln in darunter befindliche Dewarbecher in flüssige Luft fielen. 10 bis 150 Sekunden später geschah das gleiche mit den symmetrischen Muskeln. In dieser Anordnung war es nicht möglich, die Muskeln direkt zu reizen, auch nicht, sie sich isometrisch kontrahieren zu lassen. Schließlich hing es von der Reaktionszeit der Experimentatoren ab, ob das Abschneiden der Nerven und die Unterbrechung des Stromes genau koinzidierten. Während deshalb zunächst in einigen weiteren Versuchen die Muskeln an isometrischen Hebeln befestigt und direkt gereizt wurden — in diesem Falle wurden sie durch Anheben der Dewarbecher gefroren —, gingen wir dann zu einer Anordnung über, die die verschiedenen Variationen gestattete und gleichzeitig beim Eintauchen der Muskeln in die flüssige Luft den Strom selbsttätig unterbrach. Dazu diente das beistehend abgebildete Gestell (s. Abb. 1). Es bestand aus einer Hartgummiplatte, bei der in der Mitte rechtwinklig nach unten eine zweite Hartgummiplatte befestigt war, die das Überspritzen der flüssigen Luft nach der anderen Seite verhinderte. In der horizontalen Platte befanden sich jederseits drei Löcher, in die Messingstäbe zum Befestigen der Muskeln geschraubt wurden. Je nachdem, ob direkt oder indirekt gereizt werden sollte, wurde die auf der rechten oder linken Seite der Abbildung dargestellte Anordnung verwandt, — natürlich für beide Seiten stets die gleiche. Die Messingstäbe für direkte Reizung besaßen ein Zwischenstück aus Hartgummi, der Reizstrom durchsetzte die sechs hintereinander geschalteten Muskeln, von

[1]) Kurze Mitteilung, Pflügers Arch. 210, 790, 1925.

denen jeder 1 bis 1,5 g wog. Waren die unteren Klemmen, in denen die Achillessehne befestigt war, herabgezogen, so daß der Muskel eine gewisse Anfangsspannung besaß, so kontrahierte er sich isometrisch, oder, richtiger, auxotonisch, wenn wir mit *Hill* annehmen, daß der Gastrocnemius sich überhaupt nicht streng isometrisch kontrahieren kann. War die Klemme hochgezogen, verkürzte er sich ohne Belastung. Für indirekte Reizung wurden die Muskeln in derselben Weise befestigt, die Nervi ischiadici wurden über die auf der Hartgummiplatte befestigten Silberdrähte gebrückt. Die Gastrocnemien wurden stets mit dem Femur präpariert. Die übrigen Unterschenkelmuskeln dienten zur Bestimmung des Milchsäureanfangs-

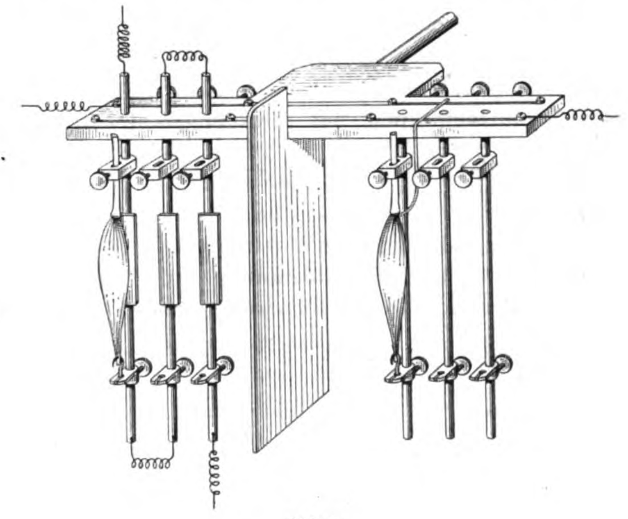


Abb. 1.

gehalts. Ein nicht seltenes Mißgeschick war, daß auf der Höhe des isometrischen Tetanus ein Knochen brach. Auf diese Weise gingen zunächst nicht wenige Versuche verloren. Denn wenn auch nur ein einziger Knochen gebrochen war und der Muskel infolgedessen abriß, war die Anordnung nicht mehr symmetrisch. Wir vermieden dies später, indem wir die Anfangsspannung der Muskeln klein machten. Die Ausschaltung des Reizstroms geschah durch einen am Fuß des Dewarbechers angebrachten Messingstift, der beim Heben des Dewargefäßes genau in der Höhe, die dem Eintauchen der Muskeln entsprach, einen Schlüssel im Primärkreis öffnete. Durch die Einstellung der Höhe des Schlüssels konnte der Moment der Stromöffnung variiert werden, so daß er mit dem Beginn des Eintauchens oder auch mit dem vollen Untertauchen der Muskeln zusammenfiel. Doch machte dies praktisch keinen Unterschied.

Zur Beurteilung der Versuchsresultate sei das Folgende vorausgeschickt: Die früheren Erfahrungen des einen von uns hatten gezeigt, daß der Tätigkeitsstoffwechsel des isolierten Kaltblütermuskels gegen Schädigungen aller Art äußerst empfindlich ist. Um die Veränderung, die durch die Kontraktion hervorgerufen wird, reversibel zu gestalten,

durften die Muskeln niemals direkt gereizt werden, wie übrigens schon *Parnas*[1]) feststellte. Aber auch bei Reizung vom Nerven aus durfte die Ermüdung nicht mit zu starkem Strome geschehen oder zu lange fortgesetzt werden. Schließlich erwies sich die Restitutionsfähigkeit von dem Zustand der Frösche abhängig. Weitaus am besten erholten sich frisch gefangene Herbstfrösche[2]). Ungeachtet dieser Rücksichten ging aber dennoch ein Teil dieser Versuche dadurch verloren, daß die Oxydationssteigerung nicht mehr auf den Ruhewert zurückkehrte, die Veränderung also teilweise irreversibel war. Ja, auch in den bestverlaufenen Versuchen war es doch durch Vergleich des Milchsäureschwunds mit den myothermischen Ergebnissen von *Hill* und *Hartree* nicht unwahrscheinlich, daß jede stärkere Anhäufung von Milchsäure eine gewisse Beeinträchtigung der Erholungsfähigkeit des Muskels hervorrief. Da nun der im Falle unvollständiger Erholung regelmäßig beobachtete Mehrverbrauch an Sauerstoff darauf hindeutet, daß die Milchsäurebildung über die Reizperiode hinaus gesteigert sein kann [was auch direkt festgestellt wurde[3])], so haben wir unser Augenmerk hauptsächlich auf die Art der Reizung gelenkt und dadurch den Schlüssel zu den Beobachtungen *Embdens* gefunden.

Das Ergebnis der im folgenden mitgeteilten Versuche sei hier vorweggenommen.

1. In sämtlichen Versuchen, in denen die Muskeln während 5 bis 15 Sekunden *indirekt* gereizt wurden, stimmte innerhalb der Fehlergenauigkeit die am Schluß der Reizperiode vorhandene Milchsäure mit der 10 bis 150 Sekunden später gefundenen genau überein. Dies gilt sowohl für 17 einwandfreie Versuche sowie noch eine Reihe weiterer, die wir wegen Unregelmäßigkeiten, Abreißen einzelner Muskeln usw. nicht in die Tabelle aufgenommen haben.

2. In sämtlichen sieben Versuchen, in denen die Muskeln mit Induktionsströmen von übermaximaler Stärke *direkt* gereizt wurden, fand eine beträchtliche Nachbildung von Milchsäure statt, die 30 bis 90 Proz. der während des Tetanus entstandenen betrug. Gleichzeitig ließ sich eine Nachkontraktur der Muskeln beobachten.

3. In fast allen Versuchen, in denen die Muskeln *direkt* mit Strömen gereizt wurden, die ungefähr einen eben maximalen Tetanus hervorriefen, fiel die Milchsäurebildung genau in die Reizperiode hinein (in fünf einwandfreien Versuchen von 3 bis 12 Sekunden viermal Koinzidenz, einmal eine beträchtliche Nachbildung).

---

[1]) Zentralbl. f. Physiol. **30**, 1, 1915.

[2]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **182**, 288, 1920, sowie nicht publizierte spätere Beobachtungen.

[3]) Pflügers Arch. **204**, 327, 1924.

4. Daß die nach 2. mehrgebildete Milchsäure für den Arbeitsprozeß verloren ist, geht daraus hervor, daß die in einer Serie von isometrischen Einzelzuckungen erhaltene Spannungsleistung im Verhältnis zur Milchsäure (der isometrische Koeffizient der Milchsäure K_m) bei ähnlicher Überreizung erheblich verkleinert ist, woraus zu ersehen ist, daß ein gewisser Betrag der Milchsäure nicht zur Spannungsentwicklung gedient hat; auch hier ergab sich ein Parallelismus dieser Extramilchsäure mit der Höhe der Nachkontrakturen am Anfang der Kontraktionsserie. Weitere Versuche, auf die weiter unten eingegangen wird, stützen dies Resultat.

1. Versuche mit indirekter Reizung.

In den ersten zehn Versuchen der Tabelle VII wurde die erste Anordnung benutzt, in den anderen, sowie in den später beschriebenen die zweite. Die Frösche der Versuche 1 bis 4 waren nicht vorgekühlt und hatten infolgedessen das hohe, oben beschriebene Ruheminimum der im Freien gehaltenen Herbstfrösche von 0,05 bis 0,08 Proz. Da die Versuchsgenauigkeit hierdurch zu gering wird, wurden von Versuch 5 an die Frösche 2 Tage im Eisschrank gehalten, wodurch das Ruheminimum in der Regel auf 0,015 bis 0,035 Proz. sinkt; allerdings kann gelegentlich wegen der hohen Erregbarkeit durch Tötungskrämpfe der Ruhegehalt wieder auf 0,05 Proz. oder auch etwas mehr steigen. Ferner wurden in den ersten Versuchen die Muskeln bis zum Versuchsanfang gekühlt, so daß die Temperatur bei der Reizung unter Zimmertemperatur lag. Hierdurch wird die Kontraktionsdauer verlängert und gleichzeitig werden die Muskeln geschont. Andererseits ist aber die Milchsäurebildung im Tetanus geringer wegen des „chemischen" Temperaturkoeffizienten, den der Energieumsatz im Tetanus besitzt. In diesem Falle betrug die Milchsäurebildung nur etwa 0,012 Proz. in 10 Sekunden. Von Versuch 9 an wurden daher umgekehrt die Muskeln durch Einlegung in vorgewärmte Ringerlöung auf 20 bis 21° gebracht, in Versuch 14 auf 24°, wodurch die Milchsäurebildung im Tetanus steigt. Diese betrug dann bei isotonischer Kontraktion in 10 Sekunden 0,015 bis 0,020 Proz., bei auxotonischer Kontraktion 0,020 bis 0,028 Proz. Wird während des Tetanus der Reizstrom ganz kurz zwei- bis dreimal unterbrochen und dadurch die Ermüdung oder Blockierung der Nervenendplatte aufgehoben, so wird noch etwas mehr Milchsäure bei 10 Sekunden langer Reizung gebildet. 0,030 Proz. ist jedoch die größte Menge, die der Muskel ohne Schädigung in einem Zeitraum von 12 Sekunden produzieren kann. Um die im Tetanus gebildete Milchsäure festzustellen, wurden bei dem schwankenden Anfangsgehalt in den ersten Versuchen einige Stichproben des Ruheminimums gemacht, späterhin aber stets die übrig gebliebenen Unterschenkelmuskeln zur Bestimmung des Ruhewertes benutzt. Allerdings liegt in diesen das Ruheminimum durchschnittlich 0,011 Proz. höher als im Gastrocnemius (vier Versuche mit 0,09, 0,011, 0,012, 0,013 Proz. Differenz). Bei sehr kleinem Ruhewert ist die Differenz wahrscheinlich etwas geringer. Zur Berechnung der im Tetanus gebildeten Milchsäure mußte diese Differenz von dem bestimmten Ruhewert abgezogen werden, wodurch eine gewisse Unsicherheit in diese Größe hineinkommt; doch ist die genaue Kenntnis derselben nicht nötig. In der Mehrzahl der Versuche wurden Doppelbestimmungen der Milchsäure gemacht; nur späterhin

geschah dies zwecks Zeitersparnis nicht mehr. Die gemessene Milchsäure ist in den Tabellen in Milligrammen und außerdem in Prozenten des Muskelgewichts angegeben. Ferner ist die Temperatur, die Kontraktionsform und -dauer und die Erholungszeit verzeichnet. Die Reizung geschah durch zwei Akkumulatoren im Primärkreis mit Rollenabstand 7 bis 5 cm, in einigen Fällen 0 cm. Die Reizstärke wurde absichtlich übermäßig stark gewählt, um einen etwaigen Einfluß auf das Resultat festzustellen. Alle Versuche fanden im Herbst 1924 und 1925 statt. Die Zahl der Gastrocnemien jeder Seite war in der Regel 3. Die Jodtitration für die Milchsäurebestimmung geschah in einer *Bang*schen Mikrobürette für 10 ccm, die Oxydation der Milchsäure mit n/1000 $KMnO_4$; im übrigen wurde wie oben angegeben verfahren.

Tabelle VII.

Milchsäuregehalt nach indirekter tetanischer Reizung sofort und nach „anaerober Restitution".

A. Versuchsdaten.

Nr.	Muskelgewicht jeder Seite	Temperatur	Reizdauer Sek.	Kontraktionsart und Anordnung	Ruhepause Sek.	Milchsäure am Reizende mg	Milchsäure nach Ruhepause mg	Milchsäure am Reizende Proz.	Milchsäure nach Ruhepause Proz.
1	4,45	Gekühlt	5	Isotonisch I	10	2,78	2,86	0,062	0,061
						2,93	2,70	0,066	0,064
2	3,35	„	10	„	25	2,17	2,17	0,065	0,065
						2,34	2,40	0,070	0,0715
3	2,07	„	10	„	12	1,82	1,81	0,088	0,087
						1,88	1,83	0,091	0,088
4	3,12	„	10	„	10	3,38	3,20	0,108	0,103
						3,38	3,18	0,108	0,102
5	4,02	Zimmertemperatur	15	„	150	1,72	1,58	0,043	0,0395
						1,82	1,50	0,045	0,037
6	3,05		15	„	10	2,06	2,02	0,0675	0,066
						1,94	1,90	0,064	0,062
7	3,32		10	„	60	2,49	2,42	0,075	0,073
						2,49	2,37	0,075	0,072
8	4,22		12	„	150	1,35	1,70	0,032	0,040
						1,52	1,81	0,036	0,043
9	2,50	21°	10	„	10	1,00	0,95	0,040	0,038
						1,08	1,03	0,043	0,042
10	2,42	Zimmertemperatur	15	„	40	0,69	0,77	0,0285	0,032
						0,68	0,745	0,028	0,031
11	3,80	20°	10	Isotonisch II	20	1,31	1,36	0,034	0,036
						1,33	1,35	0,035	0,036
12	4,36	20	5	Isometrisch II	20	2,39	2,36	0,055	0,051
						2,08	2,23	0,048	0,054
13	3,78	20	10	Isotonisch II	30	2,03	1,63	0,054	0,041
						1,97	1,56	0,052	0,043
14	3,62	24	5	Isometrisch II	30	1,59	1,61	0,044	0,045
						1,56	1,69	0,043	0,047
15	3,06	21	12	Isotonisch II	30	1,20	1,20	0,039	0,039
						1,16	1,09	0,038	0,036
16	4,07	21	12	Isometrisch II	30	2,84	2,76	0,070	0,068
17	1,83	21	12		30	1,17	1,16	0,064	0,064

B. Berechnung der Milchsäure.

Nr.	Ruhegehalt Proz.	Tetanusendgehalt Proz.	Milchsäurezunahme im Tetanus Proz.	Änderung des Gehalts nach der Ruhepause (d) Proz.
1	Nicht bestimmt (über 0,05)	0,064	etwa 0,010	— 0,0015
2		0,0675	„ 0,012	+ 0,0008
3		0,0895	„ 0,012	— 0,0025
4		0,108	„ 0,012	— 0,0055
5	Frösche gekühlt (etwa 0,03)	0,044	„ 0,016	— 0,0058
6		0,0658	„ 0,016	— 0,0018
7		0,075	„ 0,014	— 0,0025
8		0,034	„ 0,015	+ 0,0075
9		0,0415	„ 0,020	— 0,0015
10	0,013	0,0282	0,015	+ 0,0033
11	0,018	0,0345	0,017	+ 0,0015
12	0,035	0,0515	0,017	+ 0,001
13	0,024	0,052	0,028	— 0,011
14	0,018	0,0435	0,0255	+ 0,0025
15	0,020	0,0385	0,0185	— 0,001
16	0,042	0,070	0,028	— 0,002
17	0,035	0,064	0,029	0,000
			Durchschnitt $\left(\frac{\Sigma d}{17}\right)$	— 0,0010

Die in der Tabelle VII angeführten Messungen sind hinsichtlich der Milchsäurebestimmungen von gleicher Genauigkeit, dagegen von verschiedener hinsichtlich der im Tetanus zugebildeten Milchsäure wegen des hohen Ruheminimums der ersten Versuche und der geringfügigen tetanischen Milchsäurebildung bei diesen. In den letzten Versuchen dagegen wurde eine möglichst große Milchsäurebildung im Tetanus angestrebt. Gleichwohl erscheint es richtig, die Fehlerabweichung einheitlich für die ganze Serie zu berechnen. Es ergibt sich der mittlere Fehler $m = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$ zu $\pm$ 0,0011, etwa 6 Proz. der durchschnittlich im Tetanus zugebildeten Milchsäure und 2 bis 3 Proz. der gesamt vorhandenen. Die tatsächlich gefundene durchschnittliche Verringerung des Milchsäuregehalts um 0,0010 Proz. fällt ganz in die Fehlergrenzen hinein.

2. Versuche mit überstarker direkter Reizung.

Bei überstarker direkter Reizung tritt in jedem Falle eine beträchtliche Nachbildung von Milchsäure auf, die in sieben Versuchen bei Rollenabständen zwischen 8 und 0 cm und 4 Volt im Primärkreis bei 9 bis 16 Sekunden langer Reizung zwischen 0,015 und 0,03 Proz. betrug und 30 bis 90 Proz. der im Tetanus gebildeten Milchsäure aus-

machte. In Versuch 25 der folgenden Tabelle VIII wurde nur 3 Sekunden gereizt, die Nachbildung war entsprechend geringer. In allen Versuchen wurde die Anordnung II verwandt. In Versuch 24 wurde festzustellen versucht, ob die Nachbildung von Milchsäure nach 30 Sekunden abgeschlossen war. Wir stellten daher von demselben Frosche ein Semimembranosus-Doppelpräparat und zwei Gastrocnemienpräparate her. Unmittelbar nach der Reizung wurden die Semimembranosi gefroren, 30 Sekunden später der eine Gastrocnemius und 1 Minute darauf der zweite. Die Nachbildung der Milchsäure, die in ihrem absoluten Betrage wegen etwaiger ungleicher Milchsäurebildung in den verschiedenartigen Muskeln hier nicht genau zu bestimmen ist, war jedenfalls nach 30 Sekunden nahezu, aber vielleicht noch nicht ganz abgeschlossen. Ein ähnlicher Versuch befindet sich auch in einer Tabelle *Embdens*, wo nach 10 Sekunden die Nachbildung noch bei weitem nicht abgeschlossen war.

Bei den stark gereizten Muskeln zeigt sich eine bedeutende Nachkontraktur nach dem Aufhören der Reizung. Diese hängt, wie die weiter unten beschriebenen Tatsachen zeigen, offenbar ursächlich mit der Nachbildung der Milchsäure zusammen.

Tabelle VIII.

Milchsäuregehalt nach überstarker, direkter, tetanischer Reizung sofort und nach Ruhepause.

A. Versuchsdaten.

Nr.	Gastrocnemiengewicht jeder Seite	Temperatur °C	Reizdauer Sek.	Kontraktionsart	Ruhepause Sek.	Milchsäure am Reizende mg	Milchsäure nach Ruhepause mg	Milchsäure am Reizende Proz.	Milchsäure nach Ruhepause Proz.
18	3,47	20	12 (3 mal unterbrochen)	Isometrisch	30	1,70	2,49	0,049	0,072
19	3,70	20	13 (3 mal unterbrochen)	„	30	2,27	3,12	0,061	0,084
20	3,43	20	10 (3 mal unterbrochen)	„	30	3,17	3,67	0,092	0,107
21	2,04	20	12 (2 mal unterbrochen)	„	30	1,12	1,77	0,055	0,085
22	2,57	20	16 (3 mal unterbrochen)	„	40	2,77	3,20	0,107	0,124
23	2,04	20	9 (9 mal unterbrochen)	„	30	1,73	2,04	0,085	0,100
24	2,13	20	10	„	30	(1,74*)	1,38	0,043	0,065
	2,13				90		1,43	·	0,067
25	3,82	20	3	„	30	1,51	1,78	0,0395	0,0465

*) Mit Semimembranosi von 4,05 g Gewicht.

B. Berechnung der Milchsäure.

Nr.	Ruhegehalt	Tetanusendgehalt	Milchsäurezunahme im Tetanus	Änderung des Gehalts nach der Ruhepause (d)
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
18	0,017	0,049	0,032	+ 0,023
19	0,016	0,061	0,045	+ 0,023
20	0,018	0,092	0,074	+ 0,015
21	0,021	0,055	0,034	+ 0,030
22	0,049	0,107	0,058	+ 0,017
23	0,027	0,085	0,058	+ 0,015
24 a	etwa 0,015	0,043	0,028	+ 0,022
24 b				+ 0,024
25	0,024	0,0395	0,0155	+ 0,007
			Durchschnitt $\left(\frac{\Sigma d}{8}\right)$	+ 0,020

3. Versuche mit schwächerer direkter Reizung.

Daß bei genügend abgeschwächter direkter Reizung in der Regel keine Milchsäure nachgebildet wird, lehren die folgenden Versuche der Tabelle IX. In der Tat wurde von fünf einwandfreien Versuchen nur in einem Falle (Versuch 29) eine solche Nachbildung beobachtet, die obendrein so groß war (0,04 Proz.), daß dieses alleinstehende Resultat wohl sicher auf Fehler (Differenz des Ruhegehalts, ungleichmäßige Reizung oder ähnliches) zurückzuführen ist. Trotzdem aber halten wir es für wahrscheinlich, daß auch bei solcher scheinbar nicht übermäßigen Reizung sich gelegentlich eine mehr oder weniger große Nachbildung an Milchsäure ergibt, vor allem deshalb, weil die Intensität des Reizstromes und erst recht die Stromdichte bei direkter Reizung von Gastrocnemien mit faradischen Induktionsströmen völlig undefiniert ist, auch bei konstantem Rollenabstand und einer gleichen Zahl in den Sekundärkreis geschalteter Muskeln. Die mittlere Stromstärke im Primärkreis schwankt bereits mit konstanter Stromquelle bei kleinen Verstellungen im Kontakt des *Neef*schen Hammers im Verhältnis 1 : 2; der Widerstand der mit den Knochen befestigten Muskeln, bei denen der Strom den durchfeuchteten Knochen durchsetzt, hängt von der Befestigungsart und der Länge des Knochenstücks wesentlich ab (z. B. stieg der Widerstand eines 30 mm langen Gastrocnemius von 9600 auf 13000 Ohm, wenn der Muskel mit einem 1,5 cm langen Knochenstück eingeklemmt wurde). Schließlich nimmt, wie die Graduierung unseres Induktoriums ergab, die Intensität des Sekundärstroms bei Rollenabständen in der Nähe der Spulenlänge pro 1,3 cm Verschiebung auf etwa den doppelten Betrag zu. Bedenkt man ferner die wechselnde Dicke der Muskeln, so ist es einleuchtend, daß schon, ganz abgesehen von der verschiedenen Erregbarkeit, bei

scheinbar genau gleichem Aufbau der Anordnung, die Reizstärke, die für einen oder mehrere Muskeln nur eben maximal ist, bei anderen schon das Vielfache hiervon betragen kann. Gelegentliche Überreizung läßt sich daher bei direkter Tetanisierung mit Induktionsströmen in der von uns angewandten Art überhaupt nicht vermeiden.

Von den Versuchen der Tabelle IX wurden die beiden ersten am Spannungshebel mit Einschaltung von Widerstandsdraht gemacht, bei den folgenden wurde noch ein besonderer Muskel zur Spannungsmessung in den Kreis geschaltet und bei Rollenabständen von etwa 7 cm und einem Akkumulator im Primärkreis gereizt. In Versuch 30 wurde mit zwei Akkumulatoren und 7 cm Rollenabstand, aber nur 3 Sekunden bei 15° gereizt. Dieser Versuch hätte daher auch in die Tabelle VIII aufgenommen werden können, da die Reizstärke etwa zwischen der in den Tabellen VIII und IX verwandten lag.

Tabelle IX.

Milchsäuregehalt nach schwächerer, direkter, tetanischer Reizung sofort und nach Ruhepause.

A. Versuchsdaten.

Nr.	Gastrocnemiengewicht jeder Seite	Temperatur	Reizdauer	Kontraktionsart	Ruhepause	Milchsäure		Milchsäure	
						am Reizende	nach Ruhepause	am Reizende	nach Ruhepause
			Sek.		Sek.	mg	mg	Proz.	Proz.
26	3,17	Zimmertemperatur	10	Isometrisch	10	1,60	1,61	0,050	0,051
				I		1,74	1,62	0,055	0,052
27	2,16		10	Isometrisch	15	0,98	1,04	0,045	0,048
				I		1,00	1,00	0,046	0,046
28	2,72	20°	18	Isometr. II	30	1,85	1,97	0,068	0,0725
29	2,60	20	11	" II	30	1,17	2,22	0,045	0,085
30	3,63	15	3	" II	30	1,98	1,96	0,055	0,054

B. Berechnung der Milchsäure.

Nr.	Ruhegehalt	Tetanusendgehalt	Milchsäurezunahme im Tetanus	Änderung des Gehalts nach der Ruhepause (d)
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
26	0,0235	0,0525	0,029	— 0,001
27	(etwa 0,018)	0,0455	etwa 0,029	+ 0,0015
28	0,046	0,068	0,022	+ 0,0045
29	0,022	0,045	0,023	+ 0,040
30	0,030	0,055	0,025	— 0,001

Wenn die Ansicht *Embdens* zuträfe, daß unter normalen physiologischen Verhältnissen zu Beginn der Muskelkontraktion nur anorganische Phosphorsäure aufträte ohne eine entsprechende Milchsäurebildung, diese aber erst während der Fortdauer des Tetanus und nach

seinem Ende[1]), müßte offenbar unmittelbar am Ende eines *sehr kurzen* Tetanus überhaupt keine Milchsäure entstanden sein, dafür aber relativ um so mehr nachfolgen, und ferner bei Vergleich zweier aufeinander folgender Perioden des Tetanus in der zweiten mehr Milchsäure entstehen als in der ersten. Nun lehren schon die Versuche 25 und 30 mit nur 3 Sekunden langem Tetanus, daß die Milchsäurebildung hier, auf die Zeiteinheit berechnet, im Tetanus *größer* ist als bei längerer Reizung, und die Nachbildung derselben relativ nicht größer, sondern *kleiner*. Gefriert man ferner bei indirekter oder schwächerer direkter Reizung die symmetrischen Gastrocnemien während eines fortdauernden Tetanus in zwei Zeitpunkten, z. B. nach 4 und 8 oder nach 10 und 40 Sekunden, so wird in der Zeiteinheit in der zweiten Periode stets sehr viel weniger Milchsäure gebildet als in der vorhergehenden, entsprechend dem Abfall der Kontraktionshöhe. Bei indirekter Reizung, wo durch die Blockierung der Nervenendplatte die Spannung noch stärker absinkt, ist der Unterschied besonders groß. So entstanden z. B. bei 21°, isometrischer Kontraktion und indirekter Reizung von übermaximaler Stärke in einem 4 Sekunden langen Tetanus 0,027 Proz. Milchsäure, in den symmetrischen Muskeln in 8 Sekunden 0,033 Proz., also in den zweiten 4 Sekunden nur 0,006 Proz. mehr. Bei mäßig starker, direkter Reizung wurden in 10 Sekunden 0,033 Proz., in den folgenden 30 Sekunden noch 0,031 Proz. Milchsäure gebildet. *Mit der für die chemische Methode überhaupt erreichbaren Genauigkeit ergibt sich somit keinerlei Zurückbleiben der Milchsäurebildung hinter der Spannungsentwicklung und unter physiologischen Bedingungen eine vollständige Koinzidenz*[2]).

4. Vergleich von Spannung und Milchsäurebildung.

Die Annahme, daß es sich bei der Nachbildung der Milchsäure nicht um einen physiologisch mit der Arbeitsleistung des Muskels verknüpften Vorgang handelt, sondern um den Ausdruck einer Überreizung, läßt sich durch Vergleich von Milchsäurebildung und isometrischer Spannungsleistung erhärten. Die nachgebildete Extramilchsäure muß natürlich für die Arbeitsleistung verloren sein; dies

[1]) Klin. Wochenschr. 1924. S. 1394.

[2]) Diese physiologischen Bedingungen werden am ehesten durch indirekte Reizung gewahrt. Trotzdem schützt auch diese bei beliebiger Dauer des Tetanus und beliebiger Reizstärke nicht stets vor dem Auftreten der Milchsäurenachbildung. Einige orientierende Versuche mit 30 Sekunden langer, mehrfach unterbrochener Tetanisierung mit starken Strömen (RA: 0 cm bei 4 Volt im Primärkreis) gaben in diese Richtung weisende Resultate; auch kommt es hierbei zu ähnlichen Nachkontrakturen wie bei kürzerer direkter Reizung.

kann man durch Bestimmung des isometrischen Koeffizienten der Milchsäure, $K_m = \left(\frac{\text{g Spannung} \times \text{cm Muskellänge}}{\text{mg Milchsäure}}\right)$ beweisen. Die Zeitspannungsflächen bei tetanischer Reizung auszuwerten, erschien nicht möglich, weil die Flächen wegen des Spannungsabfalls zu unregelmäßig begrenzt sind. Deshalb bestimmten wir in einer größeren Versuchsreihe den isometrischen Koeffizienten bei Einzelzuckungen, hervorgerufen durch Öffnungsinduktionsschläge. Die Muskeln wurden in Stickstoffatmosphäre direkt gereizt. Der eine Muskel wurde wie früher mit Rollenabständen ermüdet, die eben maximale Zuckungen gaben, und zwar so lange, bis die Spannungshübe deutlich abzusinken begannen. Es entspricht dies etwa der Hälfte der totalen anaeroben Ermüdung. Der symmetrische Muskel wurde etwa mit der gleichen Zahl von Reizen, die aber überstark waren, ermüdet. Die Schädigung der Muskeln trat in der Mehrzahl der Fälle in der Zuckungsserie durch ein schnelleres Absinken der Spannungshöhe in Erscheinung, die nur einen Bruchteil der anfänglichen Spannungsleistung betrug, wenn bei den schwächer gereizten Muskeln noch keine Verringerung der Spannungsgröße eingetreten war. Der Reizmoment wurde durch die Bowditchuhr alle 2 Sekunden angegeben; hierdurch wurde ein Quecksilberrelais mit Stickstoffüllung betätigt, dessen Öffnung den Induktionsschlag, der zur Reizung diente, hervorrief, während der Schließungsschlag durch einen Abblender weggefangen wurde. Da durch den Widerstand der Magnetspulen des Abblenders die Stärke des Stromes im Primärkreis verringert wurde, verwandten wir hier drei statt zwei Akkumulatoren, um dieselbe Stromstärke wie bei der Überreizung nach (2) zu erhalten. Trotzdem ist zweifellos die Stromintensität im Sekundärkreis eine erheblich höhere, weil sich nur *ein* Gastrocnemius statt *sechs* in ihm befinden. Da andererseits die Muskeln gegen Induktionsschläge weniger empfindlich sind als gegen tetanische Reizung und ein quantitativer Vergleich mit den obigen Versuchen sowieso nicht möglich war, erschien diese Anordnung geboten.

In der Tabelle X sind die Resultate von sieben gleichartig angeordneten Versuchen wiedergegeben. In allen Fällen mit einer Ausnahme war der isometrische Koeffizient bei den stark gereizten Muskeln beträchtlich kleiner, und die hieraus berechnete Extramilchsäure ergab sich zu 32 bis 129 Proz. der bei normaler Reizung für die gleiche Spannungsleistung gebildeten. Der eine Ausnahmefall war schon beim Versuch selbst als solcher erkannt; der schwächer gereizte Muskel entwickelte hier bei der Einzelzuckung nur halb so viel Spannung wie der übermaximal gereizte und wurde bis zur totalen Erschöpfung ermüdet, statt, wie sonst, bis zur halben. Die Werte sind deshalb eingeklammert. Die Versuchstemperatur betrug stets 20°. Man sieht,

Tabelle X.

Isometrischer Koeffizient bei normal und überstark gereizten Gastrocnemien:

Nr.	Muskelgewicht g	Muskellänge mm	Reizung	Milchsäure Anfangsgehalt Proz.	Milchsäure gefunden mg	Milchsäure gefunden Proz.	Milchsäure durch Reizung gebildet mg	Hubzahl	Gesamtspannung kg	K_m
1	1,45	25	Überstark	0,023	4,01	0,276	3,65	272 260	158	108
		25	Normal		3,03	0,209	2,67	193 203	153	148
2	1,27	25	Überstark	0,023	3,27	0,257	2,98	270 352	128,7	104
		23	Normal		2,84	0,224	2,55	175 289	150,5	147
3	1,61	32	Überstark	0,017	4,19	0,260	3,94	324	111,2	90
			(Normal		4,12	0,256	3,87	410	109,8	91)
4	1,68	33	Überstark	0,014	3,63	0,216	3,42	257	95,9	98
			Normal		3,49	0,206	3,28	211	134,0	185
5	1,50	34	Überstark	0,045	2,91	0,194	2,24	206	56,3	85
			Normal		3,39	0,226	2,72	217	105	181
6	1,76	35	Überstark	0,026	3,57	0,203	3,11	250	89,0	100
			Normal		3,64	0,207	3,18	242	138	152
7	1,58	33	Überstark	0,032	3,21	0,203	2,71	213	45,9	56
			Normal		3,81	0,241	3,31	213	129,3	128

daß die bei der Ermüdungsserie gebildete Milchsäure stets um 0,2 Proz. betrug, also der Hälfte der Ermüdungsmaxima der Herbstfrösche entsprach. Der Milchsäuregehalt der normal gereizten und überreizten Muskeln stimmte annähernd überein; der Unterschied des K_m rührt zur Hauptsache von der Verschiedenheit der Spannungsleistung her. Als Ruhelänge des Muskels haben wir wie früher die schlaffe Länge vom Ansatz der Achillessehne bis zur Kniekehle benutzt, etwa 5 Proz. weniger als die Länge des Muskels in situ. Aus Vergleich der Werte des Spannungslängendiagramms des Gastrocnemius und der parallelfaserigen Oberschenkelmuskeln nach *Meyerhof* und der Messungen von *Mashimo*[1]) für parallelfaserige Bündel des Gastrocnemius berechnet *Hill*[2]), daß die Faserlänge des Gastrocnemius nur zu 63 Proz. der Ruhelänge des Muskels angesetzt werden soll. Tut man dies, so muß der von uns gefundene Wert für K_m mit $\frac{0,63}{0,95} = 0,66$ multipliziert werden. Man erhält dann statt des mittleren $K_m = 140$ für normal gereizte Gastrocnemien der ersten Ermüdungshälfte ein K_m korrigiert gleich 93. Da K_m für den Sartorius nach *Matsuoka* 105 ist[3]), ein Wert, den wir

[1]) Journ. of Physiol. 49, 37, 1924/25.
[2]) Proc. Roy. Soc. B. 98, 506, 1925.
[3]) Pflügers Arch. f. Physiol. 202, 573, 1924.

in neueren Versuchen wieder erhalten haben, ist vielleicht der *Hill*sche Faktor etwas zu klein. Aber jedenfalls stimmt der korrigierte K_m-Wert für Gastrocnemien und Sartorien annähernd überein. (In früheren Versuchen war K_m für den halb ermüdeten Gastrocnemius zu 125 gefunden statt 140, der ältere Wert ist wahrscheinlich wegen eines zu klein angesetzten Ruhegehalts an Milchsäure, der nicht extra bestimmt wurde, zu klein.)

In den Versuchen 1 und 2 der Tabelle X wurden je zwei Gastrocnemien verwandt, sonst je einer. Der Milchsäureanfangsgehalt wurde stets an den übrigen Unterschenkelmuskeln bestimmt.

Auch in diesen Versuchen fiel ein Parallelismus zwischen der Verkleinerung des isometrischen Koeffizienten und der Größe der Kontrakturen auf, die in den ersten Zuckungen der Ermüdungsserie als Folge der überstarken Reizung auftreten. Mißt man diese annähernd durch die Erhöhung der Anfangsspannung des Muskels in Gefolge der Kontraktion in Intervallen von 2 Sekunden zwischen den Reizen, so betrug z. B. die maximale Kontrakturspannung in den Versuchen 4 bis 7 : 46, 39, 54 und 230 g und bei Zusammenzählen der gesamten Kontrakturspannungen entsprechend 500, 486, 700, 1830 g Gesamtspannung. Andererseits berechnet sich die Verkleinerung des Koeffizienten bzw. die Extramilchsäure in Prozenten der für die Arbeitsleistung verwandten Milchsäure nach der Formel: $\frac{K_m - K_m^*}{K_m^*} \cdot 100$ (K_m^* isometrischer Koeffizient bei Überreizung) in den Versuchen 1, 2, 4 bis 7 zu 32, 51, 45, 54, 52 und 129 Proz. Die besonders große Kontraktur im letzten Falle fällt also mit der stärksten Extramilchsäurebildung zusammen.

Wenn hier ein Zusammenhang besteht, muß offenbar die Verkleinerung des K_m noch deutlicher werden, wenn der Versuch früher abgebrochen wird, da die Nachkontrakturen nach etwa 20 Zuckungen verschwinden. Dies ist nun ausgesprochen der Fall. Die Zuckungsreihe wurde hierfür statt nach 200 bis 300 Kontraktionen schon nach etwa 50 Kontraktionen abgebrochen. Der K_m-Wert für normale Reizung wird dann allerdings recht ungenau, weil die Korrektur für den hohen Anfangsgehalt der Milchsäure nicht genau und die Zubildung hier geringfügig ist; doch ergibt sich der Wert in der richtigen Größenordnung zu 123 und 165 in zwei Versuchen für Muskeln ganz verschiedener Länge und verschiedenen Gewichts, der K_m^*-Wert für überreizte Muskeln dagegen zu 38 und 31, die Extramilchsäure danach zu 230 und 410 Proz. der zur Arbeitsleistung benutzten. Auch hier wieder entsprachen sich Kontrakturhöhe und Extramilchsäure, denn die maximale Kontrakturspannung betrug in den beiden Versuchen 64 und 313 g, die Gesamt-

spannung der Kontrakturen 980 bzw. 2260 g. Diese beiden Versuche sind in der Tabelle XI verzeichnet.

Tabelle XI.

Vergleich der isometrischen Koeffizienten für den Anfangsteil der Ermüdungsserie.

Nr.	Muskelgewicht	Muskellänge	Reizung	Milchsäure				Hubzahl	Gesamtspannung	K_m
				Anfangsgehalt	gefunden	gefunden	durch Reizung gebildet			
	g	mm		Proz.	mg	Proz.	mg		kg	
8	2,04	36	Überstark	0,066	2,88	0,141	1,53	49	16,0	**38**
			Normal		2,12	0,104	0,775	53	26,5	**123**
9	1,07	25	Überstark	0,042	1,51	0,141	1,06	50	13,22	**31**
			Normal		0,93	0,083	0,44	73	29,0	**165**

Außerdem ist das Myogramm von Versuch 8 in Abb. 2 abgebildet; hier sind die im Text erwähnten Einzelheiten, die Erniedrigung der Fußpunktlinie durch die Kontraktur, sowie der raschere Abfall der Spannung bei der Überreizung ersichtlich.

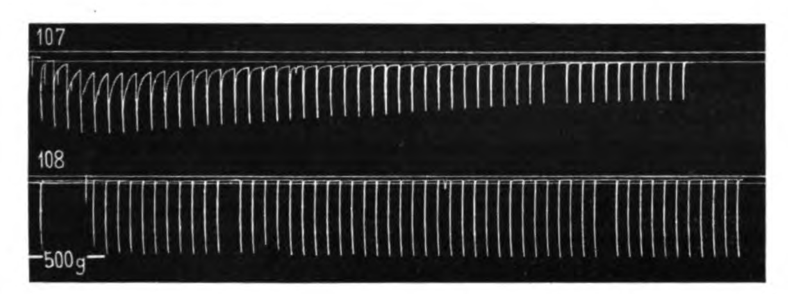


Abb. 2. Obere Kurve: Nr. 107. Überreizung. 1,53 mg Milchsäurebildung. 16,0 kg Spannung. Untere Kurve: Nr. 108. Normale Reizung 0,775 mg Milchsäurebildung; 26,5 kg Spannung. Die beiden oberen Horizontalen entsprechen der Spannung 0, die unteren der gewählten Anfangsspannung; der Abstand der Fußpunkte der Kurve 107 von dieser zweiten Horizontalen entspricht der Kontrakturspannung.

Die nachgebildete Milchsäure würde also die Kontraktur bei exzessiver Reizung hervorrufen, wobei aber die Spannungsproduktion pro Einheit Milchsäure kleiner ist als beim Tetanus.

Danach hat die durch die *Embden*schen Befunde aufgeworfene Frage eine sehr einfache Lösung gefunden: Das oben erörterte Dilemma, *wie* die *nach* der Kontraktion erfolgende Milchsäure*bildung* für die Arbeitsleistung ausgenutzt werden könnte, wo doch die Milchsäure*entfernung* als Restitutionsvorgang aufzufassen ist, erledigt sich damit, daß diese nachgebildete Milchsäure für die Arbeitsleistung verloren ist.

5. Vergleich mit den kalorimetrischen und myothermischen Messungen.

Die energetische Deutung der Vorgänge der Muskelkontraktion basiert auf der Koordination zahlreicher, mit verschiedenen Methoden gewonnener Daten aus den einzelnen Phasen des Arbeitszyklus. Dementsprechend wird man eine scheinbar dazu im Widerspruch stehende isolierte Beobachtungsreihe, für die eine solche Koordination gar nicht versucht wird, von vornherein mit Mißtrauen betrachten dürfen. Die Annahme *Embdens*, daß seine Beobachtung mit der anaeroben verzögerten Wärmebildung von *Hartree* und *Hill* zusammenhinge, findet jedenfalls in den bisher publizierten Versuchen der englischen Forscher keine Stütze; denn diese Wärme kam bei ihnen erst nach Ablauf von 30 Sekunden bis 1 Minute vom Ende der Kontraktion an zum Vorschein. Bei der Nachbildung von Milchsäure muß aber eine anaerobe Extrawärme in der ersten Minute nach der Reizung auftreten, die unter normalen Umständen nicht beobachtet wird. Die Herren *Hartree* und *Furusawa*, Cambridge, haben auf unsere Bitte hin dies untersucht und voll bestätigt: Nach einem Tetanus von $^1/_{20}$ Sekunde, der mit übermaximal starken Induktionsströmen erzeugt wird, tritt im Sartorius in dem sonst wärmefreien Intervall unmittelbar im Anschluß an die Kontraktion eine erhebliche Extrawärme auf, die in ihren Versuchen zwischen 34 und 80 Proz. der initialen Wärme betrug und zum größten Teil in die erste Minute nach der Reizung fiel, von hier langsam im Laufe von 10 Minuten abklang[1]). Durch diese Bestätigung unserer Befunde wird von neuem gezeigt, daß die erst nach längerer Reizung analysierbaren Stoffwechselvorgänge sich in entsprechenden Zeitabschnitten auch bei kurzer Reizung mit myothermischen Methoden nachweisen lassen, und daß beide Wege zu dem gleichen Ziele führen. Obendrein ist dies letztere Verfahren gerade für das hier behandelte Problem erheblich genauer. Denn, wenn jede Schädigung und Überreizung des Muskels vermieden werden soll, ist, wie oben gezeigt, die in wenigen Sekunden gebildete Milchsäure so gering, daß sie verhältnismäßig ungenau zu bestimmen ist und es einer langen Versuchsserie bedarf, um zu einwandfreien Resultaten zu gelangen.

---

[1]) Siehe Pflügers Arch. 211, 644, 1926. Durch den gestreckteren Verlauf dieser Extrawärme im Sartorius gegenüber dem Gastrocnemius, der mit der Verschiedenheit der Muskeln, vielleicht auch mit der kürzeren Reizdauer in den Versuchen von *Furusawa* und *Hartree* zusammenhängen dürfte, erhält diese Überreizungswärme eine gewisse Ähnlichkeit mit der früher zu groß gefundenen anaeroben Restitutionswärme von *Hartree* und *Hill*. Danach halten die Cambridger Forscher es für möglich, daß ihre älteren Resultate teilweise auch auf Überreizung der in Kontakt mit den Elektroden liegenden Fasern beruhen könnten. Insofern würde also in der Tat ein Zusammenhang mit den *Embden*schen Beobachtungen bestehen.

IV. Über die Änderung der c_H bei der Spaltung des Hexosephosphats.

Von diesen Ergebnissen ist die Frage unabhängig, ob im Moment der Kontraktion neben Milchsäure anorganische Phosphorsäure im mehrfachen Betrage auftritt. Hierüber selbst haben wir nur wenige Versuche angestellt, in denen allerdings die Vermehrung des anorganischen Phosphats in den im Moment der Kontraktion getöteten Muskeln von der gleichen Größenordnung war wie die gleichzeitig gebildete Milchsäure. Jedoch darf man nach den von *Embden* und *Lawaczek*[1]) mitgeteilten Resultaten annehmen, daß häufig die Abspaltung der Phosphorsäure die Milchsäurebildung übertrifft[2]), und kann dafür eine intermediäre Spaltung des Hexosephosphats, des *Embden*schen Lactacidogens, in anorganisches Phosphat und eine labile Hexose heranziehen, wie dieses von *Embden* selbst geschieht[3]) und es auch uns aus verschiedenen Gründen wahrscheinlich erscheint[4]). Diese Veresterung und nachherige Hydrolyse, die nach den interessanten neuen Befunden von *Embden* durch verschiedene anorganische Ionen stark beeinflußt wird, dürfte durch die Bildung solchen labilen Zuckers für den Kohlehydratumsatz des tätigen Muskels von großer Bedeutung sein. Dagegen ist der Schluß des Autors, daß die Abspaltung des Phosphats in höherem Maße als die Bildung der Milchsäure die Wasserstoffionenkonzentration bei der Muskelkontraktion nach der sauren Seite verschieben müßte, wie schon kurz hervorgehoben, entschieden irrtümlich[5]). Der Irrtums *Embdens* und seiner Schule scheint aus der mißverständlichen Ausdrucksweise, der Abspaltung „freier Phosphorsäure", herzurühren, die, wie die Autoren öfters hervorheben, ja „eine viel stärkere Säure wäre als Milchsäure". Nun ist aber nur die erste Dissoziationskonstante der Phosphorsäure größer als die der Milchsäure, nämlich $1{,}1 \cdot 10^{-2}$ gegen $1{,}4 \cdot 10^{-4}$, die zweite schon außerordentlich viel schwächer, nämlich $2{,}0 \cdot 10^{-7}$. Dies Argument setzt mithin voraus, daß wirklich das primäre H-Ion, also freie Säure, bei der Hydrolyse des Phosphorsäureesters im Muskel abgespalten würde, eine schwer verständliche Annahme. Im ruhenden Muskel ist bei der Wasserstoffzahl von 7,0 bis 7,4 die Hexosephosphorsäure als Alkalisalz vorhanden, und man kann erwarten, daß bei einer Spaltung desselben in Hexose und Phosphat, etwa nach der Gleichung:

$$C_6H_{10}O_4(KHPO_4)\cdot(K_2PO_4) + 2H_2O = C_6H_{12}O_6 + KH_2PO_4 + K_2HPO_4$$

[1]) Diese Zeitschr. 127, 181, 1922.
[2]) Wir lassen außer Betracht, daß hier auch überstarke Reizung eine Rolle spielen könnte.
[3]) Springers Handb. d. Physiol. 8, 439, 1925.
[4]) Siehe z. B. *O. Meyerhof* und *K. Matsuoka*, diese Zeitschr. 150, 1, 1924.
[5]) Naturwiss. 12, 1137, 1924.

die Reaktion annähernd unverändert bleibt. *Andrews*, *Beattie* und *Milroy*[1]) schließen sogar, daß bei gleichzeitiger Bildung von Milchsäure nach Abspaltung des Phosphats die c_H weniger nach der sauren Seite verschoben wird, als in Gegenwart des Esters wegen der gesteigerten Pufferkapazität des anorganischen Phosphats.

Um uns über die hier vorliegenden Verhältnisse zu orientieren, haben wir Natriumhexosephosphat durch äquivalenten Umsatz von Calciumhexosephosphat mit Natriumoxalat hergestellt, von der Wasserstoffzahl 7,0 bis 7,4. Durch Erhitzen in einem luftleeren, zugeschmolzenen Rohre bei 110° wurde dies in die Komponenten Hexose und Phosphat vollständig aufgespalten; dabei wurde die Menge des abgespaltenen Phosphats und die Wasserstoffzahl mit der Gaskette bestimmt. Dasselbe geschah nach Zusatz von Milchsäure. Das Ergebnis ist in den folgenden Versuchen enthalten:

Versuch 1: Natrium-Hexosephosphat durch Umsatz von Calcium-Hexosephosphat mit Natriumoxalat hergestellt. Pro 1 ccm Lösung Gesamtgehalt 11,76 mg P_2O_5 = 16,2 mg H_3PO_4 (Veraschung nach *Neumann*).

Davon 0,91 mg P_2O_5 = 1,25 mg H_3PO_4 anorganisch, p_H 7,01.

Nach 11 Stunden Spaltung bei 110° 11,38 mg anorganisches P_2O_5, 97 Proz. Spaltung, p_H 6,35.

Nach vierfacher Verdünnung wiederholt, p_H 6,35.

Versuch 2: Anfangsgehalt 11,76 mg P_2O_5 pro 1 ccm, mit 0,91 mg P_2O_5 anorganisch, p_H 7,01.

Bei 110° gespalten: nach 3 Stunden 10,4 mg anorganisches P_2O_5 = 88 Proz. Spaltung, p_H 6,59.

Nach 9 Stunden 10,95 mg anorganisches P_2O_5 = 93 Proz. Spaltung, p_H 6,45.

Nach 11 Stunden 11,2 mg P_2O_5 = 96 Proz. Spaltung, p_H 6,43.

Versuch 3: Spaltung wie in den Versuchen 1 und 2 während 12 Stunden. Gehalt pro 1 ccm 10,6 mg P_2O_5, p_H vor der Spaltung 7,37, nach der Spaltung 7,00.

Nach Zusatz von 0,4proz. Milchsäure vor der Spaltung 6,43, nach der Spaltung 6,38.

Ein anorganisches Phosphatgemisch von 9,5 mg P_2O_5 änderte dagegen seine Reaktion bei Zugabe von 0,4 Proz. Milchsäure von 7,4 auf 6,67 und von 6,93 auf 6,29.

Versuch 4: Ein anderes Präparat Hexosephosphat, enthaltend 9,5 mg P_2O_5 auf 1 ccm gibt bei Zusatz von 0,4 Proz. Milchsäure eine p_H-Verschiebung von 6,99 auf 5,97.

---

[1]) Biochem. Journ. 18, 996, 1924.

Wir sehen, daß bei vollständiger Spaltung einer m/12 Lösung von Hexosediphosphat — etwa der zehnfachen Konzentration der im Muskel vorhandenen — die Wasserstoffzahl sich von 7,0 auf 6,4 oder von 7,4 auf 7,0 verschiebt. Bei unvollständiger Spaltung erhält man dazwischenliegende Werte. Die Verschiebung ist an sich geringfügig, und das gilt a fortiori für die Verhältnisse im Muskel, wo ja nur ein kleiner Bruchteil des vorhandenen Phosphats gespalten wird. Zweitens bewahrheitet sich die Annahme, daß gleichzeitig die Pufferwirkung etwas ansteigt. Für die von uns gewählte Konzentration, etwa 1 Milchsäure auf 4 Phosphorsäure, kompensieren sich beide Einflüsse genau, so daß unter diesen Umständen die gleiche Wasserstoffzahl erhalten wird, ob man Milchsäure zum Hexosephosphat zufügt oder zu den aus seiner Spaltung entstandenen Produkten. Das geht aus der folgenden Tabelle XII hervor.

Tabelle XII.

p_H-Werte in Gemischen von Hexosephosphat und Milchsäure.

Nr.	Lösung	Gehalt Prom. P_2O_5	p_H direkt	p_H nach Zusatz von 0,044 m Milchsäure
1	Phosphatpuffer	9,5	7,40	6,67
	„	9,5	6,93	6,29
2	Hexosephosphat ungespalten	10,6	7,37	6,48
	„ gespalten	10,6	7,00	6,38
3	„ ungespalten	9,0	6,99	5,97

Möglich ist, daß bei Erhitzung aus dem Zucker saure Produkte entstehen, so daß die c_H bei fermentativer Spaltung noch weniger verschoben werden würde. Im Endeffekt wird, wie oben gezeigt, die Säuerung im ermüdeten Muskel allein durch die Milchsäure hervorgerufen. Ob momentan in bestimmten Räumen, „Verkürzungsorten", während der Spannungsentwicklung die Wasserstoffzahl durch eine kleine Menge Milchsäure stärker verschoben werden kann, ehe sie Zeit hat, mit dem Protein und Phosphat zu reagieren, kann nicht sicher entschieden werden, ist aber jedenfalls gut möglich. Da Hexosephosphat durch die Zellmembranen nicht permeiert, wohl aber das Milchsäuremolekül, so könnte z. B. eine solche Trennung durch verschiedene Löslichkeit in einer nicht wässerigen Phase herbeigeführt werden. Bereits oben in Kapitel II wurde ja gezeigt, daß die Milchsäure die Wasserstoffzahl eines alkoholischen Extrakts um eine Zehnerpotenz mehr als im wässerigen Extrakt verschiebt, wegen der Schwerlöslichkeit des zweibasischen Phosphats in Alkohol. Auf welche Weise diese Verschiebung durch Abgabe von Alkali von seiten des Proteins kon-

traktionswirksam sein könnte, ist gelegentlich diskutiert worden[1]) und braucht hier nicht genauer ausgeführt zu werden[2]).

Zusammenfassung.

1. Bei Vergleich der verschiedenen, zur Messung der c_H im ruhenden, ermüdeten und starren Muskel anwendbaren Methoden erweist sich am geeignetsten die Extraktion der eiskalt zerkleinerten Muskulatur mit destilliertem Wasser und anschließende Messung mit der Chinhydronelektrode. Die Zunahme der c_H bei Ermüdung und Starre ist bei Hungerfröschen geringer als bei frisch gefangenen Herbstfröschen, in Parallele zu der entsprechenden Zunahme der Milchsäure. Setzt man zu der ruhenden Muskulatur die gleiche Menge Milchsäure hinzu, wie sie im ermüdeten oder starren Muskel gebildet wird, so findet man in den Extrakten nach Eintritt des Gleichgewichts dieselben Wasserstoffzahlen. Die Milchsäure ist also allein für die Verschiebung der c_H verantwortlich. Hierbei zeigen die Hungerfrösche eine geringere Pufferkapazität als die Herbstfrösche, was jedenfalls mit für das niedrigere Milchsäuremaximum bei ihnen verantwortlich ist.

2. Bei der Ermüdung des Muskels verschiebt sich der Aschengehalt zwischen dem alkoholunlöslichen und dem alkohollöslichen Anteil der Muskelsubstanz derart, daß 1 bis 2,5 Proz. Sulfatasche (bezogen auf das Trockengewicht des alkoholischen Rückstandes) aus dem Rückstand in den Alkoholextrakt übertreten, während 2 bis 2,75 Proz. Milchsäure (auf das gleiche Trockengewicht bezogen) gebildet sind. Hieraus berechnet sich, daß die Milchsäure bei der Ermüdung eine etwa äquivalente Basenmenge aus dem alkoholunlöslichen Anteil der Muskelsubstanz frei macht. Während an dieser „Verschiebung“ der Asche die Phosphate selbst nur in geringem Maße beteiligt sind, ist andererseits ein Teil des alkoholunlöslichen Materials, das die Basen fixiert, selbst Phosphat. Der Rückstand läßt sich in einen wasserlöslichen und einen wasserunlöslichen Teil zerlegen, die zu etwa gleichen Teilen an der Lieferung fixer Basen für die in den Alkohol übertretende Milchsäure beitragen; der größte Teil der Basenabgabe der wasserlöslichen Fraktion muß auf

[1]) Z. B. „Naturwissenschaften“ 12, 1137, 1924.

[2]) Von *Embden* wird gegen diese Argumentation angeführt, daß die Milchsäure auch momentan an keinem Orte im Muskel eine andere Wasserstoffzahl herbeiführen könnte, als sie das Phosphat bedingt, „wegen des gleichzeitigen Entstehens beider Säuren aus dem gleichen Molekül“ (Handb. d. Physiol. 8, 408). Nach *Embdens* eigener oben erwähnten Annahme würden aber Milchsäure und Phosphat nicht gleichzeitig aus dem Hexosephosphat frei, sondern die Milchsäure entstände aus einer intermediär gebildeten Hexose, so daß schon hierdurch leicht eine räumliche Trennung von Phosphat und Milchsäure herbeigeführt werden kann.

Phosphat bezogen werden. Der Rest und die Alkaliabgabe des wasserunlöslichen Teils kann auf Eiweiß bezogen werden, das danach die Hälfte bis zwei Drittel der zur Neutralisierung der Milchsäure dienenden Basen liefern würde.

3. Im Gegensatz zu den Befunden *Embdens*, nach denen die Milchsäurebildung zu einem erheblichen Teil der Kontraktion nachfolgen sollte, ergibt sich: Bei indirekt 10 bis 12 Sekunden tetanisch gereizten Muskeln fällt die Milchsäurebildung vollständig in die Kontraktionszeit hinein. Bei überstarker, direkter Reizung findet in den ersten 30 Sekunden nach Ablauf der Kontraktion eine erhebliche Nachbildung der Milchsäure statt, in der Größenordnung der während des Tetanus entstandenen, mit gleichzeitiger Kontraktur. Bei schwächerer direkter Reizung findet in der Regel keine Nachbildung an Milchsäure statt. Die nachgebildete Milchsäure bei überstarker Reizung beruht auf Schädigung des kontraktilen Apparats und ist für die Arbeitsleistung verloren. Denn die Spannungsleistung pro Einheit gebildeter Milchsäure sinkt bei Reizung mit Einzelinduktionsschlägen unter ähnlichen Umständen in etwa demselben Maße, wie es der Nachbildung von Milchsäure bei Dauerkontraktionen entspricht. Auch hier besteht ein Parallelismus zwischen der Bildung dieser Extramilchsäure und der Größe der Kontrakturen.

4. Bei Spaltung von Hexosephosphat in Zucker und Phosphat bei der Wasserstoffzahl des ruhenden Muskels wird das p_H wenig verändert, es verschiebt sich z. B. von 7,4 auf 7,0 oder von 7,0 auf 6,4; gleichzeitig steigt die Pufferkapazität der Lösung an, so daß z. B. in Gegenwart von Milchsäure im Verhältnis 1 : 4 zur Phosphorsäure die Wasserstoffzahl dieselbe ist, ob das Hexosephosphat gespalten ist oder nicht. Die Säuerung des ermüdeten und starren Muskels wird demnach ausschließlich durch die Milchsäure herbeigeführt. Wie im Moment der Kontraktion an den Verkürzungsorten die c_H höher steigen kann als bei räumlichem und zeitlichem Ausgleich nach Ablauf derselben, kann nur hypothetisch beantwortet werden.

Über den Einfluß des Berylliums auf die Fermentbildung.

Von

Ferdinand Lehr.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 25. November 1925.)

Jacoby[1]) und seine Schüler haben eine Reihe von Substanzen beschrieben, von denen manche die Bildung, andere die Wirkung von Ureasen zu steigern vermögen. Die Stoffe, welche die Wirkung steigern, sind von *Jacoby* Auxoureasen benannt worden. Durch Forschungsergebnisse der letzten Jahre steht es fest, daß bestimmte biologische Vorgänge durch einige anorganische Substanzen weitgehend beeinflußt werden können. So wurde von *Madsen*[2]) und seinen Mitarbeitern[3]) nachgewiesen, daß die Antikörperbildung bei verschiedenen Infektionskrankheiten durch Metallinjektionen um ein Vielfaches gesteigert wird. Das Beryllium erwies sich bei diesen Untersuchungen zum Teil als besonders wirksam. Diese Ergebnisse haben die Anregung gegeben, den Einfluß des Berylliums auf die Urease zu untersuchen.

Die frühere Methodik von *Jacoby* wurde beibehalten. Für die quantitative Auswertung der Urease kamen in je einen Kolben 20 ccm einer 2proz. Harnstofflösung in *Soerensen*scher Phosphatmischung (m/15, $p_H = 7,2$), 0,05 g Leucin, 10 ccm Phosphatmischung, eine bestimmte Menge Berylliumchlorid (konzentrierte Lösung von *Kahlbaum*) bzw. dieselbe Menge NaCl in den Kontrollen und 1 ccm einer etwa 4 Tage alten Kultur von Proteus *x* 19 oder Proteus *Hoffmann* erster Abimpfung von Bouillonkulturen auf folgendem Nährboden[4]): 1,2 g NaCl, 0,08 g $MgSO_4$, 0,1 g Dikaliumphosphat, 0,01 g $CaCl_2$, 0,81 g asparaginsaures Natrium, 0,82 ccm einer 73proz. Lösung von milchsaurem Natrium, mit Aqua dest. auf 200 ccm aufgefüllt. Die sofort verschlossenen Kolben wurden auf etwa 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Das gebildete Ammoniak wurde nach dieser Zeit in n/10 H_2SO_4 durch Wasserdampf überdestilliert, die Kohlensäure durch Aufkochen entfernt und die verbrauchte Säure durch Titration bestimmt.

---

[1]) Diese Zeitschr. **79**, 35; **80**, 357; **81**, 332; **83**, 74; **84**, 354; **86**, 329, **88**, 35.

[2]) The journ. of state med. **31**, Februar 1923; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **103**, 447.

[3]) *Walbum* und *Schmidt*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **42**, 32.

[4]) *Hagihara*, diese Zeitschr. **140**, 171.

Es zeigte sich, daß bei dieser Anordnung 0,1 ccm $BeCl_2$ die Fermentwirkung steigert:

1. 20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch,
   0,1 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 41,5, 49,8, 57,3 [1])
   20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch,
   0,1 NaCl, 1 ccm Kultur 30,0, 40,1, 50,9

Die absoluten Ausschläge waren bei schwächerer Ureasewirkung nicht immer so stark, wie folgender Versuch zeigt:

2. 20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch,
   0,1 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 23,0
   20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch,
   0,1 NaCl, 1 ccm Kultur 18,1

Ohne Leucinzusatz sind die Ausschläge im allgemeinen absolut schwächer, doch läßt sich auch hier die steigernde Wirkung von 0,1 $BeCl_2$ deutlich erkennen, da es sich um die erste Abimpfung von der Bouillon handelt:

3. 20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch 0,1 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 28,6, 30,7 [1])
   20 „ 10 „ 0,1 NaCl, 1 „ „ 12,8, 19,0

In einem Falle von besonders starker Ureasewirkung der Bakterien kam es zu folgendem Resultat:

4. 20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,1 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 56,1
   20 „ 10 „ 0,1 NaCl, 1 „ „ 26,0

Bei schwacher Ureasebildung wird dagegen ohne Leucinzusatz der Unterschied bei Berücksichtigung der Fehlergrenze kaum erkennbar:

5. 20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,1 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 8,7
   20 „ 10 „ 0,1 NaCl, 1 „ „ 6,0

Die Menge von 0,1 ccm der konzentrierten $BeCl_2$-Lösung, welche zur Vermeidung von Ungenauigkeiten beim Pipettieren stets in zehnfacher Verdünnung (es wurde also bisher stets 1 ccm zugesetzt) gebraucht wurde, hat sich als Optimum bei der geschilderten Versuchsanordnung erwiesen. Bei 0,2 und 0,15 $BeCl_2$ war die Fermentwirkung gehemmt:

6. 20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch,
   0,2 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 32,5
   20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch,
   0,2 NaCl, 1 ccm Kultur 38,8

   Ohne Leucinzusatz:

7. 20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,2 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 7,0
   20 „ 10 „ 0,2 NaCl, 1 „ „ 11,2

8. 20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch,
   0,15 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 35,7
   20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch,
   0,15 NaCl, 1 ccm Kultur 40,8

---

[1]) Getrennte Versuche, Kontrollversuche in der nächsten Zeile darunter.

9. 20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,15 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 11,9
20 „ 10 „ 0,15 NaCl, 1 „ „ 14,8

Kleinere Mengen als 0,1 ccm ergeben keinen deutlichen Unterschied:

10. 20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,075 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 39,7
20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,075 NaCl, 1 ccm Kultur 41,4

11. 20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,075 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 16,0
20 „ 10 „ 0,075 NaCl, 1 ccm „ 14,0

12. 20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,05 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 39,4
20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,05 NaCl, 1 ccm Kultur 38,1

13. 20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,05 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 13,6
20 „ 10 „ 0,05 NaCl, 1 ccm „ 11,0

14. 20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,025 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 34,6
20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,025 NaCl, 1 ccm Kultur 36,3

15. 20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,025 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 8,5
20 „ 10 „ 0,025 NaCl 1 ccm „ 8,5

16. 20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,01 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 39,3
20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,01 NaCl, 1 ccm Kultur 41,2

17. 20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,01 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 20,9
20 „ 10 „ 0,01 NaCl, 1 „ „ 18,2

18. 20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,001 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 42,4
20 Harnstoff, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 0,001 NaCl, 1 ccm Kultur 42,7

Auch weiteres Herabgehen bis auf 0,001 mg $BeCl_2$ zeigte keinen Unterschied.

Bei Zusatz von Beryllium zum Phosphatgemisch entsteht ein weißer Niederschlag, der bis zu den Konzentrationen von 0,01 $BeCl_2$ deutlich sichtbar ist. Die Bedeutung dieses Niederschlags für den Fermentprozeß kann a priori eine verschiedene sein. Einerseits ist es möglich, daß durch Adsorption der Urease an den Niederschlag das Ferment von störenden Beimengungen gereinigt und auf diese Weise in seiner Wirkung gesteigert wird. Frühere Beobachtungen[1]) lassen an derartige Zusammenhänge denken; für die Auswirkung des Calciums kommt allerdings nach den Versuchen von *Kochmann*[2]) eine derartige Adsorption nicht in Frage. Andererseits könnte man aber auch daran denken, daß der Niederschlag durch Entziehung wirk-

[1]) *Jacoby* und *Shimizu*, 128, 103.
[2]) Diese Zeitschr. 151, 259.

samer Bestandteile die Fermentwirkung abschwächt. Um diese Verhältnisse zu klären, wurden zunächst die Phosphate aus dem Versuch ausgeschaltet und statt ihrer destilliertes Wasser bzw. Natriumacetat verwendet:

19. 20 Harnstoff (2 Proz. in Aqua dest.), 0,05 Leucin, 10 Aqua dest., 0,1 $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 1,0
20 Harnstoff (2 Proz. in Aqua dest.), 0,05 Leucin, 10 Aqua dest., 0,1 NaCl, 1 ccm Kultur 37,1

Diese Hemmung durch das Beryllium bleibt bis zu den Konzentrationen von 0,01 mg deutlich:

20. 20 Harnstoff (2 Proz. in Aqua dest.), 0,05 Leucin, 10 Aqua dest., 0,01 mg $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 33,9
20 Harnstoff (2 Proz. in Aqua dest.), 0,05 Leucin, 10 Aqua dest., 0,01 mg $BeCl_2$, 1 ccm Kultur 44,4

Unterhalb dieser Grenze ist das Beryllium unwirksam.

Das Natriumacetat erwies sich für diese Versuche als ungeeignet, weil es an sich die Ureasewirkung der Proteusbakterien herabsetzt:

21. 20 Harnstoff in n/1 Natriumacetat, 0,05 Leucin, 10 n/1 Natriumacetat, 1 ccm Kultur 4,2
20 Harnstoff in n/5 Natriumacetat, 0,05 Leucin, 10 n/5 Natriumacetat, 1 ccm Kultur 11,6
20 Harnstoff in n/10 Natriumacetat, 0,05 Leucin, 10 n/10 Natriumacetat, 1 ccm Kultur 21,8
20 Harnstoff in n/20 Natriumacetat, 0,05 Leucin, 10 n/20 Natriumacetat, 1 ccm Kultur 26,9
20 Harnstoff in Aqua dest., 0,05 Leucin, 10 Aqua dest., 1 ccm Kultur 34,0

Mit den Konzentrationen des Natriumacetats wurde nicht weiter heruntergegangen, weil der Zweck, die Lösung zu puffern, bei zu niedrigen Natriumacetatkonzentrationen doch nicht erreicht wird.

Auf diesem Wege ist also die Bedeutung des Niederschlags nicht zu erklären. Deshalb wurde der Niederschlag, ebenso wie es *Kochmann* mit dem Calciumphosphatniederschlag gemacht hatte, vor dem Zusatz des Ferments abfiltriert und mit 5 ccm Aqua dest. nachgewaschen; das Leucin wurde in die nunmehr vollkommen klare Lösung mit 10 ccm Aqua dest. hineingespült. Zu der Kontrolle kamen der Gleichmäßigkeit wegen 15 ccm Aqua dest.:

22. 20 Harnstoff (2 Proz. in Phosphatgemisch), 10 Phosphatgemisch, 0,1 $BeCl_2$ (filtriert, mit 5 ccm Aqua dest. nachgewaschen), 0,05 Leucin, 10 Aqua dest., 1 ccm Kultur 45,8, 45,2
20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,1 $BeCl_2$, 0,05 Leucin, 15 Aqua dest., 1 ccm Kultur 44,3, 47,5
20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 0,1 NaCl, 0,05 Leucin, 15 Aqua dest., 1 ccm Kultur 38,0, 39,0

Die Verstärkung der Fermentwirkung durch $BeCl_2$ bleibt also auch nach dem Abfiltrieren des Niederschlags bestehen.

Es steht bisher folgendes fest:

1. In *Soerensen*scher Phosphatmischung steigert Beryllium in der Konzentration von 0,1 die Ureasewirkung der Proteusbakterien. Schwächere Konzentrationen sind unwirksam, stärkere hemmen den Fermentprozeß. Die Wirkungssteigerung bleibt auch nach dem Abfiltrieren des Niederschlags von Berylliumphosphat bestehen.

2. In wässeriger Lösung hemmt Beryllium die Harnstoffspaltung durch Bakterienurease sehr stark.

Es ist also sicher, daß im Phosphatgemisch, also wohl in gepufferter Lösung, das Beryllium anders wirkt als in wässeriger, also nicht gepufferter Lösung.

Bevor der Einfluß des Berylliums auf die Urease weiter ermittelt wurde, ist versucht worden, in den Wirkungsmechanismus des biologisch viel besser durchgearbeiteten Calciums tiefer einzudringen. Da diese Substanzen einander im periodischen System der Elemente nahe stehen, konnte man brauchbare Analogien erwarten. *Kochmann* hatte gezeigt, daß die Wirkung der Jackbohnenurease durch Calcium entsprechend seiner Konzentration gesteigert wird. Auch der Bakterienurease gegenüber verhält sich Calcium wirkungssteigernd, die Wirkung nimmt hier jedoch in den untersuchten Breiten mit der Konzentration des Calciums nicht zu:

23. 20 Harnstoff in Phosphatgemisch, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 1 ccm $CaCl_2$ (1proz.), 1 ccm Kultur 48,4
20 Harnstoff in Phosphatgemisch, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 1 ccm NaCl, 1 ccm Kultur 40,9

24. 20 Harnstoff in Phosphatgemisch, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 2 ccm $CaCl_2$ (1proz.), 1 ccm Kultur 47,7
20 Harnstoff in Phosphatgemisch, 0,05 Leucin, 10 Phosphatgemisch, 2 ccm NaCl, 1 ccm Kultur 41,3

Bei Zusatz von Calcium zum Phosphatgemisch entsteht ebenso wie bei der Verwendung von Beryllium ein weißer Niederschlag. Die Steigerung der Fermentwirkung durch das Calcium wird durch den Niederschlag nicht beeinflußt.

25. 20 Harnstoff in Phosphatgemisch, 10 Phosphatgemisch, 1 $CaCl_2$ (filtriert, mit 5 ccm Aqua dest. nachgewaschen), 0,05 Leucin, 10 Aqua dest., 1 ccm Kultur 42,6
20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 1 $CaCl_2$, 0,05 Leucin, 15 Aqua dest., 1 ccm Kultur 42,7
20 Harnstoff, 10 Phosphatgemisch, 1 NaCl, 0,05 Leucin, 15 Aqua dest., 1 ccm Kultur 32,9

Für die Jackbohnenurease war diese Tatsache von *Kochmann* nachgewiesen worden. Hierbei wird sogar durch das Abfiltrieren des Niederschlags die Calciumwirkung noch gesteigert.

Bisher ist noch kein Beweis dafür erbracht, ob überhaupt und in welcher Menge Calcium ins Filtrat geht; es steht lediglich fest, daß Zusatz der Phosphatmischung zum Filtrat keinen grob sichtbaren Niederschlag gibt. Daher wurde zunächst der Calciumnachweis im Filtrat vorgenommen:

26. 20 Harnstoff (2 Proz. in Phosphatmischung), 10 Phosphatmischung, 1 $CaCl_2$ (1 Proz.). Der Niederschlag von Calciumphosphat wird nach 10 Mi-

nuten langem Stehen abfiltriert. Zu dem vollkommen klaren Filtrat wird erst Liqu. ammon. caust. bis zum Auftreten einer alkalischen und dann HCl bis zum Auftreten einer schwach sauren Reaktion tropfenweise zugesetzt. Darauf wird mit Ammoniumoxalat gefällt. Es entsteht ein flockiger weißer Niederschlag von Calciumoxalat. Die quantitative Bestimmung wurde mit der zehnfachen Menge der reagierenden Substanzen ausgeführt, da zu erwarten war, daß die ins Filtrat übergehenden Calciummengen nur gering sind. Resultat (durch 10 dividiert): 0,61 mg Ca.

Es ist also nur etwa der fünfte Teil des zugesetzten Calciums, der die Steigerungen in der Ureasewirkung hervorruft.

Kochmann hatte ferner gefunden, daß die Calciumwirkung dann besonders stark ist, wenn das Calciumchlorid zuerst mit dem Harnstoff in Berührung gebracht wird. Er hat deswegen zur Erklärung der Auxowirkung des Calciums an die Bildung der Komplexverbindung $[Ca(OCN_2H_4)_6](NO_3)_2$ gedacht im Sinne der von *Werner* studierten Einlagerungsverbindungen. Wenn diese Voraussetzung richtig ist, so müßte man bei der quantitativen Bestimmung des Calciums im Filtrat nach Zerstören der eventuell vorhandenen Komplexverbindung mehr Calcium finden als bei sofortigem Ausfällen des Calciums.

27. In zwei Kolben kommen je 200 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatmischung, 100 Phosphatmischung und 10 $CaCl_2$ (1 Proz.). Der Niederschlag wird abfiltriert. Im Kolben I wird sofort die Oxalatfällung vorgenommen. Das Filtrat im Kolben II wird nach Zusatz von 10 ccm konzentrierter HCl 1 Stunde lang gekocht, um die etwa vorhandene Komplexverbindung sicher zu zerstören. Resultat (durch 10 dividiert): Kolben I = 0,6 mg Ca, Kolben II = 0,58 mg Ca; also kein Unterschied.

Für die Existenz einer Komplexverbindung läßt sich auf diese Weise kein Beweis finden. Es ist aber denkbar, daß diese Komplexverbindung bei ihrer Labilität bereits durch wenig eingreifende Manipulationen — wie etwa die Oxalatfällung — bereits zerstört wird. Es ist auch möglich, daß während des Fermentprozesses die Harnstoffspaltung über eine Komplexverbindung geht. Schließlich kann man auch eine Ringbildung zwischen Ferment, Calcium und Harnstoff annehmen. Für solche Möglichkeiten läßt sich aber mit keiner der uns bekannten Methoden ein experimenteller Beweis erbringen. Am nächsten liegt es, die Auxowirkung des Calciums auf ionisiertes Ca zurückzuführen.

Die Wirkung des Berylliums auf die Bakterienurease bleibt, wie vorhin mitgeteilt, auch nach Abfiltrieren des Niederschlags von Berylliumphosphat bestehen. Das Filtrat bleibt auch nach Zusatz weiterer Phosphatlösung klar. Es ist also auch hier zunächst der Beweis zu führen, daß die Steigerung der Ureasewirkung in diesem Falle auf der Anwesenheit von Beryllium beruht. Die qualitative Bestimmung des Berylliums erfolgt mit Ammoniak oder Alkalilauge. Da durch beide Stoffe gleichzeitig die Phosphate gefällt werden, so müssen sie vorher entfernt werden. $BeCl_2$ ist löslich in Alkohol, Phosphate dagegen nicht. Auf diese Weise kann man beide voneinander trennen:

28. 20 ccm Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatmischung, 10 ccm Phosphatmischung, 0,1 ccm $BeCl_2$. Der Niederschlag wird abfiltriert;

das Filtrat zur Trockne eingedampft; diese in Alkohol gelöst; die alkoholische Lösung filtriert; das Filtrat wiederum zur Trockne eingedampft und diese abermals in Alkohol gelöst. Nach dreimaligem Lösen in Alkohol, Filtrieren und Eindampfen wird der Trockenrückstand in destilliertem Wasser gelöst. Die Uranylacetatreaktion ist jetzt negativ, wohl fällt aber nach Zusatz von Ammoniak Beryllium aus.

29. Der abfiltrierte Niederschlag von Berylliumphosphat wird durch 10 ccm n HCl und einigen Tropfen konzentrierter HCl in Lösung gebracht, das Filter mit 10 ccm n HCl nachgewaschen. Die Lösung wird auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft, diese in Alkohol gelöst usw., wie im vorhergehenden Versuch. Auch hier wird auf dieselbe Weise Beryllium nachgewiesen.

Eine quantitative Berylliumbestimmung ist uns nicht bekannt. Versuche, das Beryllium auf die geschilderte Art und Weise quantitativ zu bestimmen, haben wir nicht angestellt, da die Methode uns für diese Zwecke zu verlustreich erschien. Man muß aus den Versuchen schließen, daß wohl verhältnismäßig geringe Berylliummengen bereits die fördernde Wirkung haben, allerdings nur unter den Bedingungen, die im Phosphatversuch gegeben sind.

Es fragt sich nun, ob das Beryllium direkt fördernd auf das fertige Enzym einwirkt oder ob es indirekt irgend einen Prozeß in der Bakterienzelle beeinflußt, der vielleicht der Fermentbildung förderlich ist. Man kann die Fragestellung auch dahin präzisieren, ob das Beryllium ebenso wie das Calcium ein Auxokörper ist oder ob es ähnlich dem Leucin die Bildung des Ferments steigert. Zur Entscheidung dieser Frage werden zunächst Versuche mit der Jackbohnenurease angestellt:

30. In jeden Kolben kommen 0,3 ccm Olivenöl zur Vermeidung des Schäumens beim Destillieren und 0,3 ccm Toluol als Antiseptikum; das Ferment wird in 0,15 proz. wässeriger Lösung verwendet.

0,1 NaCl, 20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 10 Fermentlösung 119,9

0,1 $BeCl_2$, 20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 10 Fermentlösung 85,5

0,1 $BeCl_2$, 20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, filtriert, 10 Fermentlösung 88,5

0,2 $BeCl_2$, 20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, filtriert, 10 Fermentlösung 6,5

Bei 0,01 $BeCl_2$ ist die Hemmung nicht mehr nachweisbar:

31. 0,01 NaCl, 20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 10 Fermentlösung 127,0

0,01 $BeCl_2$, 20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 10 Fermentlösung 128,6

0,01 $BeCl_2$, 20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, filtriert 10 Fermentlösung 125,7

Da zwischen der Bakterien- und der Jackbohnenurease Verschiedenheiten bestehen könnten, wurden diese Versuche mit gepulvertem Bakterienferment[1]) wiederholt. In Kolleflaschen wurden Massenkulturen von Proteus *Hoffmann* angelegt. Nach 48stündigem Wachstum wurde der Kulturrasen mit einem rechtwinklig gebogenen Glasstab vorsichtig abgeschabt und mit destilliertem Wasser in einen Glasteller gespült. Diese Bakterienaufschwemmung wurde im *Faust*schen Apparat zur Trockne eingedunstet, der Trockenrückstand vom Glasteller abgekratzt und gepulvert. Es folgen die Versuche:

32. In jeden Kolben werden zunächst 0,3 ccm Olivenöl und 0,5 ccm Toluol getan.

20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 0,1 $BeCl_2$,
0,05 Ferment, 10 Phosphatgemisch 23,1, 22,6, 22,6, 23,0[2])
20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 0,1 NaCl,
0,05 Ferment, 10 Phosphatgemisch 26,4, 26,9, 26,2, 26,0

33. 20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 0,05 $BeCl_2$,
0,05 Ferment, 10 Phosphatgemisch 23,5, 23,3
20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 0,05 NaCl,
0,05 Ferment, 10 Phosphatgemisch 23,7, 24,0
20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 0,025 $BeCl_2$,
0,05 Ferment, 10 Phosphatgemisch 23,9, 24,0
20 Harnstoff (2 Proz.) in Phosphatgemisch, 0,025 NaCl,
0,05 Ferment, 10 Phosphatgemisch 24,1, 23,9

Der Unterschied in den Kontrollen zwischen den Versuchen 32 und 33 dürfte sich dadurch erklären, daß der Versuch 33 etwa 10 Tage später unternommen worden ist, während welcher Zeit das Fermentpulver wahrscheinlich an Wirksamkeit abgenommen hat. Es ist also zweifellos, daß $BeCl_2$ in der Konzentration von 0,1 ccm die Wirkung gepulverter Bakterienurease nicht fördert. Somit erscheint die Schlußfolgerung berechtigt, daß die stimulierende Wirkung des Berylliums auf einer Steigerung der Fermentbildung durch die Proteusbakterien beruht, sei es, daß die einzelne Bakterienzelle nach Berylliumzusatz zu stärkerer Fermentproduktion angeregt wird, sei es, daß auf diesen Reiz hin die Bakterien sich stärker als gewöhnlich vermehren; auch in diesem Falle wäre ja mit der Bildung einer größeren Fermentmenge zu rechnen.

Zusammenfassung.

$BeCl_2$ steigert in der Konzentration von 0,1 ccm die Ureasewirkung der Proteusbakterien in *Soerensen*scher Phosphatmischung. Diese Menge hat sich für die erwähnte Wirkung als Optimum erwiesen insofern, als größere Mengen hemmen, kleinere dagegen unwirksam

---

[1]) *Jacoby*, diese Zeitschr. 84, 354; *Takahata*, ebendaselbst 140, 168.
[2]) Getrennte Versuche, Kontrollversuche in der nächsten Zeile darunter.

sind. Von dem bei Zusatz des Metalls zum Phosphatgemisch entstehenden Niederschlag ist diese Wirkung unabhängig; da beim Abfiltrieren des Niederschlags Beryllium sowohl im Niederschlag als im Filtrat nachweisbar ist, so ist die Steigerung der Ureasewirkung auf einen kleineren als den ursprünglich zugesetzten Anteil des Berylliums zurückzuführen. In destilliertem Wasser hemmt Beryllium sehr stark die Ureasewirkung der Proteusbakterien. Die Wirkung der Jackbohnenurease hemmt Beryllium ebenfalls, die der gepulverten Bakterienurease wird durch Beryllium nicht gesteigert. Daher erscheint die Annahme berechtigt, die Wirkung des Berylliums bestehe in der Anregung der Bakterienzelle zu vermehrter Fermentproduktion.

An der von *Kochmann* gefundenen Wirkungssteigerung der Jackbohnenurease durch Calcium ist nur etwa der fünfte Teil des zugesetzten Calciums beteiligt. Calcium erhöht auch die Wirkung der Bakterienurease, doch scheint hier zwischen der Konzentration des Calciums und der Fermentwirkung in den untersuchten Breiten kein Parallelismus zu bestehen.

Über die Hagedornsche Blutzuckerbestimmung.

Von

Emerich v. Fazekas.

(Aus der II. internen Klinik der Budapester königl. ungar. Universität.)

(Eingegangen am 25. November 1925.)

Jüngst erschien in dieser Zeitschrift eine Mitteilung von *Hagedorn* über ein neues Verfahren zur Blutzuckerbestimmung, das die Reduktion des *Ferri*cyankaliums zu *Ferro*cyankalium zur Bestimmung des Blutzuckers verwendet.

A. Rosenthal hat mit dem *Hagedorn*schen Verfahren nach einiger Modifikation Prüfungen angestellt. Ich konnte leider weder mit dem ursprünglichen Verfahren, noch mit der *Rosenthal*schen Modifikation zufriedenstellende Resultate erreichen. Die Ursache liegt darin, daß *das Ferricyankalium* — wenn auch weniger als das Kupferoxyd — *labil ist*; es erleidet bei stärkerem Erhitzen auch spontane Reduktion, die so beträchtlich sein kann, daß ich z. B. nach 15 Minuten langem Aufkochen nur noch Spuren von $K_3Fe(CN)_6$ vorfinden konnte. Das Ferrocyankalium kann sich auch zu Ferricyankalium oxydieren.

Wir können diesen Fehlern abhelfen durch Herabsetzung der Dauer des Aufkochens und durch ihre genaue Innehaltung, ferner auch durch Anwendung einer konzentrierteren Kaliumferricyanidlösung als *Hagedorn* vorschrieb. Der Wärmegrad wird — meiner Erfahrung nach — die Werte nicht besonders beeinflussen, wenn die Erwärmung von entsprechender Dauer ist. Eine weitere Schwierigkeit der Methode ist noch die langwierige Befreiung des Blutes von Eiweiß.

Diese geringfügigen Schwierigkeiten und kleinen Störungen suchte ich durch einige Modifikationen zu beseitigen.

Der Patient nimmt ein wenige Minuten dauerndes Handbad in warmem Wasser, darauf werden aus einem angestochenen Finger ein paar (zwei bis drei) Tropfen Blut mit *Bang*schem Papier aufgefangen und mit der Torsionswage abgewogen. 100 mg Blut ergeben die besten Resultate. (Wenn keine Torsionswage zur Verfügung steht, werden wir das Blut mit Hilfe einer kalibrierten Pipette abmessen und dann auf das Papier ausblasen.) Nach dem Eintrocknen des Blutes wird das Papierstückchen in ein breites

(*Bang*sches) Probiergläschen gebracht und 8 ccm Uranylacetatlösung werden vorsichtig zufließen gelassen. Wir lassen jetzt ½ bis 1 Stunde lang stehen.

Nach Verlauf dieser Zeit wird das Papier mit Hilfe einer langen Pinzette entfernt; die weiteren zur Bestimmung erforderlichen Operationen, selbst die Titration, werden ebenfalls in diesem Gläschen verrichtet. Auf diese Weise kann man den durch ein etwaiges Übergießen entstehenden Flüssigkeitsverlust, der bei einer Mikromethode von besonderer Wichtigkeit ist, vermeiden.

Nunmehr werden 2 ccm Kaliumferricyanid und 5 ccm 0,5proz. $ZnSO_4$-Lösung zugesetzt und darauf 4 Minuten lang im Wasserbad gekocht. Nach dem Ansäuern mit einigen Tropfen einer 5proz. Essigsäurelösung tritt durch etwa 5 bis 10 Minuten langes Stehenlassen eine Abkühlung ein. Nach dem Erkalten geben wir 1 ccm 5proz. KJ-Lösung hinzu, nach etwa 5 Minuten langem Warten wird mit Stärke als Indikator und n/200 Natriumthiosulfatlösung titriert. Wir nahmen jedesmal auch Blindversuche mit gleicher Kochdauer vor. Von der Menge des verbrauchten $Na_2S_2O_3$ wird der mit Blut erhaltene Wert abgezogen und dies mit 0,0177 multipliziert. Diese Zahl ergibt den Gehalt des Blutzuckers in Prozenten ausgedrückt.

Die Modifikation besteht:

1. in der Kochdauer,
2. in der Zusammensetzung der einzelnen Lösungen,
3. in der nach *Bang* ausgeführten Befreiung von Eiweiß.

Zu 1. Nach meinen Erfahrungen erfolgt die Reduktion des Kaliumferricyanids während des Aufkochens binnen 2 Minuten, unabhängig von der vorhandenen Zuckermenge. Ein weiteres *Aufkochen* ist schon deswegen nicht zweckentsprechend, da jetzt auch das Ferricyanid eine spontane Reduktion erleiden kann. Wird aber die unter ähnlichen Bedingungen eingestellte Versuchslösung einem Aufkochen von gleicher Dauer unterworfen, so kann der Fehler ziemlich eliminiert werden. Die Dauer des Aufkochens hat ebenfalls ihre Grenzen, bei einem Aufkochen von mehr als 6 Minuten könnten sich bedeutende Differenzen ergeben.

Ich hatte zahlreiche Bestimmungen bei wechselnder Temperatur sowie mit verschiedener Dauer des Erwärmens unternommen und stellte dabei fest, daß über 60° schon die spontane Reduktion des Kaliumferricyanids erfolgt, nach 15 Minuten langem Aufkochen war das Kaliumferricyanid zum größten Teil reduziert worden, wenn seine Konzentration mit der von *Hagedorn* vorgeschriebenen übereinstimmt.

Die spontane Reduktion wird nämlich geringer sein, wenn das Kaliumferricyanid konzentrierter und die Alkalität der Lösung größer ist.

Zu 2. Wir geben noch vor dem Aufkochen reichlich $ZnSO_4$ hinzu, das sich mit dem bei der Reduktion entstehenden Ferrocyankalium zu dem unlöslichen Kaliumzinkferrocyanid verbindet. Diese Reaktion vollzieht sich ziemlich langsam, das $ZnSO_4$ muß daher noch vor dem

Aufkochen beigemengt werden (beim Erwärmen wird die Reaktion ein wenig rascher vonstatten gehen). Wird aber die *Bang*sche Eiweißfällung angewandt, so muß das $ZnSO_4$ auf jeden Fall vor dem Kochen zugefügt werden, damit die Bildung des die Titration störend beeinflussenden Uranferrocyanids verhindert wird.

Das *KJ* gaben wir zur kalten Lösung hinzu, da nach *Mohr* die Ausscheidung von Jod um so langsamer und geringer erfolgt, je wärmer und verdünnter die Kaliumferricyanidlösung ist. Ich benutze daher das Ferricyankalium in doppelt so starker Konzentration wie *Hagedorn* und verdünne es infolgedessen nicht auf 100 ccm wie *A. Rosenthal.* Die Gesamtquantität der zu untersuchenden Lösungen bleibt auch so die gleiche, das Kochen selbst wird gleichmäßiger. (*Rosenthal* hat nämlich aus diesem Grunde die Ergänzung auf 100 ccm vorgeschlagen.)

Zu 3. Die Befreiung von Eiweiß hatte ich nach *Bang* vollzogen, wegen der Raschheit, Leichtigkeit und Genauigkeit seiner Methode. Der Verlust an Substanz ist ein bedeutend geringerer als bei anderen Verfahren.

Die Bestimmungen hatten wir mit verschiedenen Zuckerlösungen sowie mit Menschen- und Tierblut unternommen. Beim Vergleich unserer Methode mit der *Bang*schen Mikromethode und dem *Bertrand*schen Makroverfahren erhielten wir bedeutend genauere Ergebnisse als mit diesen beiden Verfahren. Seit etwa 2 Jahren führen wir in dieser Weise Blutzuckerbestimmungen aus und konnten dabei feststellen, daß bei hohen Zuckerwerten die gleiche Genauigkeit wie bei niedrigen Konzentrationen erzielt werden konnte. So war es möglich, bei Coma diabeticum das infolge Insulinbehandlung eintretende Absinken des Blutzuckers von Stufe zu Stufe zu verfolgen, im Gegensatz zum *Bang*schen Verfahren, das stets verschiedene Resultate ergab. Das Herabsinken des normalen Blutzuckers konnte dabei ebensogut wahrgenommen werden.

Das Verfahren selbst bedarf, im Gegensatz zur *Bang*schen Methodik, keiner besonderen Übung und hängt nicht in solchem Maße von der Dauer des Kochens und dem Wärmegrad ab. Man braucht nicht einzeln aufzukochen, es können daher auch noch mehrere Bestimmungen vorgenommen werden.

Benötigte Reagenzien. 1. Uranylacetatlösung nach *Bang.* 2. Ferricyankaliumlösung: 100 g Na_2CO_3 + 3,3 g $K_3Fe(CN)_6$. 3. 0,5proz. $ZnSO_4$. 4. 5proz. KJ. 5. 5proz. Essigsäure und n/200 $Na_2S_2O_3$.

Literatur.

Hagedorn, diese Zeitschr. **135**, 449, 1923. — *A. Rosenthal,* ebendaselbst **138**, 449, 1923. — *Bang,* Mikromethoden zur Blutuntersuchung.

Schilddrüse und prämortale Stickstoffsteigerung beim Hungertier.

Von

Ernst Mangold.

(Aus dem tierphysiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Berlin.)

(Eingegangen am 27. November 1925.)

Der Eiweißumsatz des hungernden Säugetieres, wie er von zahlreichen Autoren, besonders beim Hunde, Kaninchen und Menschen durch Bestimmung des Stickstoffs im Harn, früher des Harnstoffs, untersucht wurde, zeigt einen Verlauf, der sich keineswegs für alle Fälle in ein einfaches Schema bringen läßt[1]). Die N-Ausscheidung kann Steigerungen, zeitweiliges Gleichbleiben und Abnahmen erfahren, so daß ihre Kurve nur selten einen stetigen, meist aber einen vom ersten Tage bis zum Hungertode mehr oder weniger schwankenden Ablauf zeigt. Folgende Möglichkeiten können sich in der verschiedensten Weise miteinander kombinieren:

1. Am ersten Tage eine individuell sehr verschiedene N-Ausscheidung, deren Größe von *C. Voit*[2]) in ihrer Abhängigkeit von der vorausgegangenen Ernährung erkannt wurde.

2. Etwa vom zweiten oder dritten Hungertage an eine Abnahme der N-Ausscheidung; sie wird auf den nunmehr beendeten Verbrauch des noch von der Nahrungsaufnahme herrührenden „zirkulierenden" Eiweißes und den Schutz des Organeiweißes durch die Kohlenhydrate zurückgeführt[1])[3]).

3. Etwa vom vierten bis sechsten Tage an oder schon früher eine Steigerung; diese wird auf den beendeten Verbrauch des größten Teils des Glykogenvorrats bezogen, nach dessen Versagen als Eiweißschützer bereits Organeiweiß in höherem Maße angegriffen wird[4]).

---

[1]) Vgl. auch *Morgulis*, Hunger u. Unterernährung, S. 131, Berlin 1923.

[2]) *C. Voit*, Zeitschr. f. Biol. **2**, 310, 1866.

[3]) *Prausnitz*, ebendaselbst **29**, 151, 1892; *May*, ebendaselbst **30**, **16**, 1894.

[4]) *Derselbe*, Münch. med. Wochenschr. 1891, S. 319; Zeitschr. f. Biol. **29**, 151, 1892.

4. Hiernach erneute Abnahme, die mit einem gesteigerten Eintritt der zunächst schwerer zugänglichen, eiweißschützenden Fettvorräte in den Stoffwechsel in Zusammenhang gebracht wird.

5. Weitere allmähliche Abnahme oder

6. Einstellung auf eine längere Zeit gleichbleibende tägliche N-Ausscheidung.

7. Erneute Steigerung, die allmählich zunimmt.

8. Rapide Steigerung in den letzten Tagen vor dem Hungertode.

Da die unter 1 bis 3 angeführten Phasen von der letzten Ernährung und der Körperbeschaffenheit zu Beginn des Hungerzustandes abhängen und daher individuell sehr verschieden auftreten oder mehr oder minder ganz ausfallen können; da ferner in manchen Fällen schon von Anfang an eine stetige Abnahme oder aber allein eine allmähliche Zunahme bis zur letzten rapiden Steigerung beobachtet wird; da endlich auch die letztere gelegentlich ausbleiben kann, so geben die aufgezählten Phasen nur ein ungefähres Bild von den Möglichkeiten, den Verlauf der N-Ausscheidung beim Hungertiere in einzelne Perioden einzuteilen.

Unter diesen beansprucht die letzte Periode, die durch eine mehr oder minder *rapide Steigerung der N-Ausscheidung* gekennzeichnet ist, in theoretischer und praktischer Beziehung ein besonderes Interesse, weil sie es ist, in der diejenigen Veränderungen des Organismus eintreten, die letzten Endes zum Hungertode führen, und weil daher die Erforschung dieser Periode und der in ihr auftretenden Veränderungen des Stoff- und Kraftwechsels die Erkenntnis der physiologischen Bedingungen des Hungertodes eröffnet.

Die Lehre von dieser *prämortalen Stickstoffsteigerung* geht experimentell auf *Frerichs*[1]) zurück, der bei einem Kaninchen am dritten Hungertage eine größere Harnstoffausscheidung beobachtete und als krankhaft aus den Fieberbewegungen erklärte, die er vor dem am vierten Tage eintretenden Hungertode annahm. *C. Voit*[2]), dem bei einer Katze in den letzten Hungertagen eine Steigerung der Harnstoffausscheidung auffiel, wies dann auf die Abhängigkeit der Eiweißzersetzung vom Fettbestande des Hungertieres und darauf hin, daß die Wirkung der Fettabnahme erst später hervortreten kann, wenn sie schon sehr bedeutend geworden und dann noch genügend Fleisch vorhanden ist. Auf dieser Anschauung fußend, hat, nachdem die prämortale N-Steigerung noch von *Falck*[3]) an Hunden, von *Schimanski*[4]) an Hühnern beobachtet, und von *Rubner*[5]) mehrfach an Kaninchen bestätigt war, letzterer den zeitlichen Zusammenhang der N-Steigerung mit dem fast völligen Schwinden der Zersetzung des bis dahin den Eiweißverlust in Schranken haltenden Fettes betont, und besonders

---

[1]) *Frerichs*, Müllers Arch. f. Anat. u. Physiol. 1848, S. 469.

[2]) *C. Voit*, Zeitschr. f. Biol. **2**, 326, 1866.

[3]) *F. A. Falck*, Beitr. z. physiol. Hyg., Pharm. u. Toxikol. **1**, 1, 1875.

[4]) *H. Schimanski*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **8**, 396, 1879.

[5]) *Rubner*, Zeitschr. f. Biol. **17**, 232, 1881.

E. Voit[1]) den Satz verfochten, daß die Verarmung des Körpers an Fett die Ursache der N-Steigerung sein müsse. Auch *May*[2]), *Kaufmann*[3]) und *Reichert*[4]) sind dafür eingetreten, daß der Zeitpunkt, an dem der schroff in die Höhe gehende Eiweißabbau das nahe Ende anzeigt, davon abhängt, wann das zur Verfügung stehende Fett eingeschmolzen ist und nun fast ausschließlich Eiweiß in Zerfall gerät.

Demgegenüber hat *F. N. Schulz*[5]) betont, daß die prämortale N-Steigerung wohl unter Umständen durch die eingetretene Fettarmut, meistens aber nur durch einen *relativen* Fettmangel, daneben aber noch durch andere Faktoren, besonders durch einen Zerfall von Körperzellen bedingt sein könne, deren Reste in den Säftestrom gelangen. *Schulz* weist darauf hin, daß der letzte rapide Kräfteverfall nicht allein durch den eintretenden *Mangel an Energievorräten*, sondern dem ganzen Eindrucke nach durch eine *wesentliche Schädigung* der vorher noch funktionsfähigen Muskelsubstanz bedingt sein müsse. Auch in gemeinsam mit mir, *Stübel* und *Hempel* durchgeführten erneuten Hungerversuchsreihen an Hunden konnte *F. N. Schulz*[6]) dartun, daß für den Eiweißumsatz im Hunger und besonders für seine abnorme prämortale Steigerung neben der Beziehung zum Fettvorrat auch noch andere Dinge maßgebend sein können[7]). Besonders die enorme Erholung durch eine vorübergehende, an sich unzureichende Fleischnahrung, die einen Hund nach dem Hungerkollaps zu einem weiteren, 62 Tage langen Hungern befähigte, befestigte die Anschauung von *Schulz*[8]), daß *Autointoxikationen am Schlusse des Hungerzustandes* ihren Einfluß auf den Stoffwechsel und besonders den Eiweißumsatz ausüben. Er denkt sich diese Vergiftungen durch eine Schädigung der wichtigen Stoffwechselorgane, z. B. der Leber, infolge des Fortfalls des Nahrungsreizes bedingt, daher die Vergiftungserscheinungen nach Darreichung geringer Nahrungsmengen wieder verschwinden[8]). Jedenfalls müsse, wie er schon früher hervorhob[9]), auch wenn sich die Hypothese vom prämortalen Zellenzerfall nicht erweisen lasse, doch auch an *innere Ursachen* gedacht werden, die ähnlich wie beim Fieber einen gesteigerten Eiweißumsatz hervorrufen. Auch *Voit*[10]) sah neben dem Fettmangel als Ursache des Hungertodes entweder eine Leistungsunfähigkeit aller Körperteile oder die Schädigung, besonders die Abnahme der Zellmasse, einer kleinen Anzahl lebenswichtiger Organe, des Gehirns, des Herzens usw. an. *Zuntz*[11]) und

---

[1]) *E. Voit*, Zeitschr. f. Biol. **41**, 571, 1901.

[2]) *R. May*, ebendaselbst **30**, 1, 1894.

[3]) *M. Kaufmann*, ebendaselbst **41**, 74, 1901.

[4]) *Reichert*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therap. **5**, 750, 1909.

[5]) *F. N. Schulz*, Pflügers Arch. **76**, 379, 1899.

[6]) *F. N. Schulz* und *E. Mangold*, *H. Stübel* und *E. Hempel*, Pflügers Arch. **114**, 419, 1906.

[7]) Die Auffassung von *Schulz* ist in der Arbeit von *Schön* in Cremers Beitr. z. Physiol. **3**, 172, 1925 durch Schreibfehler irrtümlich wiedergegeben; es muß dort mehrmals statt Eiweiß Fett und einmal statt Fett Eiweiß heißen.

[8]) *F. N. Schulz*, Pflügers Arch. **114**, 462, 1906.

[9]) *Derselbe*, Zeitschr. f. Biol. **41**, 368, 1901.

[10]) *E. Voit*, ebendaselbst **41**, 502, 1901.

[11]) *Zuntz*, *Loewy*, *Müller*, *Caspari*, Höhenklima u. Bergwanderungen, S. 284. Berlin, Bong u. Co., 1906.

Tigerstedt[1]) schlossen sich der Autointoxikationshypothese zur Erklärung der prämortalen N-Steigerung an; ersterer unter Hinweis auf das Auftreten von mangelhaft verbrannten und in den Geweben aufgespeicherten Abbauprodukten von Eiweißsubstanzen, wie es auch durch Sauerstoffmangel unter der Einwirkung des Hochgebirgsklimas bei der Bergkrankheit seinen Erfahrungen gemäß vorkommt; letzterer unter Hinweis auf die schon von *Koll*[2]) und *Schulz*[3]) vertretene Möglichkeit, daß die Zersetzungsfähigkeit der durch den Hunger geschädigten Körperzellen für das Fett vermindert sei, was eben durch jene selbst vergiftenden Substanzen verursacht sein könne. Die *Zuntz*sche Anschauung wird auch durch serologische Fermentuntersuchungen von *Jobling* und *Peterson*[4]) gestützt, die für eine Anhäufung den Organismus vergiftender Eiweißprodukte im Hungerzustande sprechen. Auch *Abderhalden, von Noorden* und *Caspari*[5]), *Morgulis*[6]) haben sich der Anschauung angeschlossen, daß toxische Produkte während des Hungers entstehen können. Wie erwähnt, wurden von *Schulz* und *E. Voit* auch schon einzelne lebenswichtige Organe als die besonders geschädigten vermutungsweise genannt.

Ein ganz bestimmtes Organ, nämlich die *Schilddrüse*, haben nun *Mansfeld* und *Hamburger*[7]) für die prämortale N-Steigerung verantwortlich gemacht, zum Teil wohl unter dem Einfluß der Arbeit von *Eppinger, Falta, Rudinger*[8]), wonach der Hungereiweißumsatz schilddrüsenloser Hunde tiefer liegt als der normaler Hunde. *Mansfeld* und *Hamburger* schlossen aus einigen Versuchen an Kaninchen, bei denen die prämortale N-Steigerung nach Schilddrüsenexstirpation in geringerem Maße auftrat, auf eine Rolle der Schilddrüse bei der prämortalen N-Steigerung des normalen Hungertieres, wobei die Möglichkeit erwogen wird, daß die im Tierkörper entstehenden autotoxischen Substanzen direkt, oder durch Hemmung der Oxydationen infolge Säuerung des Organismus, die Schilddrüse reizen, wodurch dann der gesteigerte Eiweißzerfall zustande käme.

Die Unzulänglichkeit dieser letztgenannten Versuche und ihrer Beweiskraft ist eingehend durch *Hari*[9]) dargelegt und besonders durch Hinweis darauf erwiesen worden, daß jede Form der N-Ausscheidung der schilddrüsenlosen Tiere und auch das Fehlen der prämortalen Steigerung ebenso bei normalen Tieren vorkommen kann.

Trotzdem kommt neuerdings *Ehrenberg*[10]) auf die *Mansfeld*sche Arbeit zurück und denkt seinerseits an die Möglichkeit, daß durch das Einsetzen einer Autolyse der Schilddrüse vor dem Hungertode ein Hyperthyreoidismus zustande komme, der vielleicht die prämortale N-Steigerung bedingen könne.

---

[1]) *Tigerstedt*, in Nagels Handb. d. Physiol. **1**, 388, 1909.

[2]) *Koll*, Die subkutane Fetternährung vom physiologischen Standpunkt. Habil.-Schrift, Würzburg 1897.

[3]) *F. N. Schulz*, Pflügers Arch. **76**, 384, 1899.

[4]) *Jobling* und *Peterson*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therapie **24**, 219, 1915.

[5]) *Caspari*, in Oppenheimers Handb. d. Biochem., 1. Aufl., **4**, 1, 757, 1911.

[6]) *Morgulis*, Hunger u. Unterernährung, S. 114. Berlin, Springer, 1923.

[7]) *Mansfeld* und *Hamburger*, Pflügers Arch. **152**, 50, 1913.

[8]) *Eppinger, Falta, Rudinger*, Zeitschr. f. klin. Med. **66**, 1, 1908.

[9]) *Hari*, Pflügers Arch. **176**, 123, 1919.

[10]) *Ehrenberg*, Theoretische Biologie, S. 142. Berlin, Springer, 1923

Angesichts dieser verschiedenartigen Einbeziehungen der Schilddrüse in die Lehre von der prämortalen N-Steigerung schien es wünschenswert, die Frage ihrer Beteiligung dabei durch erneute Versuche zu klären.

Es wurden daher vier gut genährte Hunde in den Hungerversuch eingestellt; bei zwei derselben exstirpierte ich die Schilddrüse unter Zurücklassung der Epithelkörperchen, die anderen beiden dienten als normale Kontrolltiere. Die N-Bestimmungen im Harn wurden nach *Kjeldahl* durch Tierarzt *Schön*[1]) ausgeführt. Über die zugleich mit der Verfolgung des Eiweißumsatzes angestellten Untersuchungen des Gesamtumsatzes mittels des Respirationsversuchs wird Dr. *W. Klein* in der hiernach folgenden Arbeit eingehend berichten.

Hier sei nur der Verlauf der N-Ausscheidung zusammengefaßt, wie er sich im einzelnen aus der Tabelle ergibt.

Hungertag für 1. u. 2. Hund	Datum 1925	1. Hund Bello, Terrier, ohne Schilddrüse		Datum 1925	2. Hund Bobby, normal	
		N-Menge g	Körpergewicht kg		N-Menge g	Körpergewicht kg
1.	9. I.	—	—	11. I.	2,648	11,0
2.	10. I.	1,316	9,15	12. I.	3,427	10,7
3.	11. I.	1,859	8,70	13. I.	—	10,36
4.	12. I.	—	8,30	14. I.	4,120	10,12
5.	13. I.	1,316	8,67	15. I.	2,755	9,90
6.	14. I.	3,337	8,30	16. I.	3,868	9,80
7.	15. I.	3,091	8,30	17. I.	*3,259*	*9,70*
8.	16. I.	*3,718*	*8,35*	18. I.	*2,083*	*9,50*
9.	17. I.	*3,192*	*8,25*	19. I.	3,987	*9,40*
10.	18. I.	*2,620*	*8,20*	20. I.	*3,214*	*9,16*
11.	19. I.	*4,300*	*8,00*	21. I.	*2,846*	*8,98*
12.	20. I.	*4,131*	*7,82*	22. I.	*3,068*	*8,85*
13.	21. I.	*3,304*	*7,75*	23. I.	3,024	8,75
14.	22. I.	2,128	7,66	24. I.	3,718	8,58
15.	23. I.	3,808	7,50	25. I.	3,046	8,46
16.	24. I.	4,984	7,40	26. I.	3,416	8,41
17.	25. I.	4,659	7,30	27. I.	3,774	8,16
18.	26. I.	4,816	7,12	28. I.	3,416	7,98
19.	27. I.	4,659	6,98	29. I.	3,920	7,81
20.	28. I.	5,017	6,76	30. I.	*3,953*	*7,72*
21.	29. I.	6,462	*6,55*	31. I.	*3,158*	*7,54*
22.	30. I.	7,824	*6,50*	1. II.	*2,800*	*7,35*
23.	31. I.	8,948	*6,35*	2. II.	*3,808*	*7,30*
24.	1. II.	Exitus	*6,15*	3. II.	*4,368*	*7,15*
25.				4. II.	3,270	7,00
26.				5. II.	4,200	6,70
27.				6. II.	6,574	6,54
28.				7. II.	5,846	6,40
29.				8. II.	Exitus	

[1]) *A. Schön*, Cremers Beitr. z. Physiol. 3, 165, 1925.

Hungertag für 3. und 4. Hund	Datum 1925	3. Hund Lotte, Terrier, ohne Schilddrüse		4. Hund Juno, Pinscher, normal	
		N-Menge g	Körpergewicht kg	N-Menge g	Körpergewicht kg
3.	3. III.	2,968	6,90	2,195	6,70
4.	4. III.	4,301	6,50	2,285	6,40
5.	5. III.	4,099	6,10	2,834	6,20
6.	6. III.	5,085	5,90	3,013	6,10
7.	7. III.	4,928	5,80	3,315	5,95
8.	8. III.	5,676	5,73	3,864	5,85
9.	9. III.	*5,240*	5,50	*4,278*	5,60
10.	10. III.	*5,667*	5,40	*4,513*	5,47
11.	11. III.	7,218	5,30	*4,995*	5,32
12.	12. III.	8,888	5,00	6,048	5,20
13.	13. III.	—	4,80	7,258	5,00
				—	4,70

Der Verlauf kann in allen vier Fällen als grundsätzlich gleich bezeichnet werden, und es läßt sich bei einem Vergleich der einzelnen Versuche nichts herauslesen, was auf ein unterschiedliches Verhalten der schilddrüsenlosen Tiere gegenüber den normalen hinweist. Das an Körpergewicht schwerere Paar, je ein thyreoprives (Nr. 1) und ein normales Tier (Nr. 2), haben den Hungerzustand doppelt bzw. über doppelt so lange ausgehalten als die beiden leichteren Hunde 3 und 4, darunter ebenfalls ein operierter (Nr. 3). Bei allen liegt das N-Minimum am Beginn des Versuchs und steigt die N-Ausscheidung fortdauernd bis zum Ende. Bei zwei Tieren, einem operierten (Nr. 1) und einem normalen (Nr. 4) ist die Steigerung in den ersten Tagen sehr gering, bei einem anderen (Nr. 3) beginnt sie deutlich schon am vierten Tage; bei den kürzer lebenden ist sie schon am sechsten Tage beträchtlicher, bei den länger lebenden wird sie es erst am elften Tage (Nr. 1) bzw. hält sich die N-Ausscheidung längere Zeit auf gleicher Höhe (Nr. 2).

Bei allen vier Hunden ist in den letzten 2 bis 3 Tagen ein schnellerer weiterer Anstieg, eine typische prämortale N-Steigerung festzustellen. Wollte man ihren Verlauf im einzelnen vergleichen, so könnte man eher sagen, daß sie bei den thyreopriven Tieren 1 und 3 mit größeren Sprüngen von Tag zu Tag auf höhere Zahlen kommt als bei den normalen. Keinesfalls aber ist eine Andeutung dafür vorhanden, daß die prämortale N-Steigerung bei den schilddrüsenlosen Tieren in geringerem Maße auftritt. Hiergegen kann auch nicht unter Berufung auf *Eppinger*,

Falta, Rudinger[1]) und andere Erfahrungen eingewendet werden, daß die Epithelkörperchen vikariierend eingetreten seien. Denn wenn auch bei Hund 1 der Hungerversuch erst 7 Monate nach der Schilddrüsenexstirpation begann und bei der Sektion ein Epithelkörperchen einen etwas vergrößerten Eindruck machte, so lag doch der Versuchsbeginn bei Hund 3 schon 5 Wochen nach der Operation und der Verlauf war doch grundsätzlich der gleiche.

Bezüglich der *Vergleichung des Verlaufs der N-Ausscheidung bei verschiedenen Tieren* sei noch auf eines hingewiesen. Das Überblicken einer derartigen Zahlenreihe, wie sie den Verlauf der täglichen N-Ausscheidung darstellt, ist mit einem unvermeidbaren Mangel behaftet, der sich auf das Verhältnis zum jeweiligen Körpergewicht und seiner täglichen Abnahme während des Hungerversuchs bezieht. Die allmähliche Zunahme der N-Werte ist tatsächlich eine viel steilere, als sie nach der Zahlenreihe erscheint, da ja schon ein Gleichbleiben der N-Werte bei ständig abfallendem Körpergewicht eine tägliche Steigerung der N-Ausscheidung bedeutet. In ähnlichem Sinne hat sich bereits *Hari*[2]) kritisch geäußert.

Trotzdem wird zweckmäßigerweise davon Abstand genommen, einen Quotienten aufzustellen und täglich zu berechnen, der die N-Ausscheidung zum Körpergewicht oder zur täglichen Gewichtsabnahme in Beziehung setzt, da das Gewicht durch die tägliche, während des ganzen Versuchs dem Tiere nach Belieben gestattete Wasseraufnahme und seine physiologischen Wasserverluste in einer ohne weitere umfassende Maßnahmen unkontrollierbaren Weise beeinflußt wird. In diesem Sinne hat auch schon *C. Voit*[3]) auf die Unzulänglichkeit der Reduktion der Größe von Exkreten auf gleiches Körpergewicht oder auf die Gewichtsabnahme bei Hungerversuchen hingewiesen.

Auch die von *Rubner*[4]) gelegentlich angewandte Reduktion des N-Verbrauchs auf 100 Teile des im Körper vorhandenen N hat sich wohl infolge der Unsicherheit der Berechnung des letzteren für Hungerversuche nicht eingebürgert. Wohl aber werden öfters zur Abkürzung der Tabellen Mittelwerte aus einzelnen, mehr oder minder willkürlich abgegrenzten Perioden für die N-Ausscheidung angegeben. *Hari*[2]) hat bereits darauf hingewiesen, daß auch diese Betrachtung aus ähnlichen Gründen unzulänglich ist, und daß nur der Überblick des ganzen Verlaufs ein richtiges Bild gibt, das, wie wir hervorhoben, seinerseits auch noch mit einer Unvollkommenheit des Eindrucks behaftet ist.

---

[1]) *Eppinger, Falta, Rudinger*, Zeitschr. f. klin. Med. **66**, 1, 1908.
[2]) *Hari*, Pflügers Arch. **176**, 162, 1919.
[3]) *C. Voit*, Zeitschr. f. Biol. **2**, 342, 1866.
[4]) *Rubner*, ebendaselbst **17**, 222, 1881.

Von großer Bedeutung dagegen, besonders auch gerade zur Aufklärung des Wesens der prämortalen Steigerung, sind differenzierende Analysen der einzelnen N-Substanzen im Harn, wie sie von *Howe, Matill* und *Hawk*[1][2]), *Morgulis, Edwards*[3]) u. a. ausgeführt wurden und die unter anderem während der prämortalen Steigerung einen Anstieg des Kreatin- und Abfall des Kreatininstickstoffs ergaben.

Auf diesem Wege würde sich auch die *autotoxische Natur des Hungertodes* im Sinne von *F. N. Schulz* gewiß näher begründen lassen. Auch unsere Versuche sprechen für die Richtigkeit dieser Auffassung. Hierzu sei noch erwähnt, daß Hund 1 bei der Sektion eine starke Gallenstauung aufwies, und am Tage vor dem Exitus, ebenso wie Hund 4 nach dem Abbrechen des Hungerversuchs, einen dünnflüssigen, stark gallig verfärbten Kot abgab. Hund 3 zeigte vollkommen das Bild einer Vergiftung, indem er am letzten Versuchstage unter plötzlich auftretender hochgradiger Schwäche eine gallig schleimige Masse erbrach; durch Sondenfütterung mit 100 ccm einer Traubenzuckerlösung mit einem Ei und 2 g Citronensäure (nach *W. Klein*) zeigte er dann bereits nach 4 Stunden eine sichtliche Kräftigung, die ihn, ebenso wie die gleichen Maßnahmen bei Hund 4, bei weiterer vorsichtiger Fütterung schon in einigen Tagen zu einem normalen Befinden zurückführte.

Es können also nicht allein die Aufzehrung der stickstofffreien Reserven und ein bestimmter Verlust an Organeiweiß sein, die den Hungertod verursachen. So dürfen wir auch in unseren Versuchen eine Stütze der *F. N. Schulz*schen Anschauungen sehen.

Beiläufig sei auf Grund der hier wiedergegebenen Versuche auch noch hervorgehoben, daß sich aus ihnen kein Hinweis auf die lebensverlängernde Wirkung der Thyreoidektomie beim Hungertier ergibt, wie sie *Marinesco* und *Parhon*[4]) auf Grund einiger weniger Kaninchenversuche glaubten annehmen zu dürfen, und wie sie auch von *Hari*[5]) in Betracht gezogen wird.

Zusammenfassung.

Vergleichende Versuche an zwei Hunden, denen die Schilddrüse exstirpiert wurde, und an zwei normalen Hunden ergaben keinen Anhaltspunkt dafür, daß die Schilddrüse den Verlauf der Stickstoff-

---

[1]) *Howe* und *Hawk*, Journ. of the Amer. chem. soc. **33**, 215, 1910.

[2]) *Howe, Matill, Hawk*, Journ. of biol. Chem. **10**, 417, 1911; **11**, 103, 1912.

[3]) *Morgulis*, Hunger u. Unterernährung. Berlin 1923.

[4]) *Marinesco* und *Parhon*, C. r. de la soc. de biol. Paris **67**, 146, 1909.

[5]) *Hari*, Pflügers Arch. **176**, 165, 1919.

ausscheidung beim Hungertier beeinflußt. Derselbe war in allen Fällen grundsätzlich der gleiche; es trat auch jedesmal eine typische prämortale Stickstoffsteigerung im Harn auf.

Der Verlauf der Versuche sprach deutlich im Sinne der Lehre von *F. N. Schulz* für das Auftreten einer Autointoxikation als Ursache für die prämortale Stickstoffsteigerung und für den Eintritt des Hungertodes.

Hunde können durch eine wenige Stunden vor dem Hungertode verabreichte, in geeigneter Weise zusammengesetzte Fütterung am Leben erhalten werden.

Respirationsversuche an Hungerhunden mit und ohne Schilddrüse.

Von

W. Klein.

(Aus dem tierphysiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Berlin.)

(Eingegangen am 27. November 1925.)

Bei den in der hier vorausgehenden Abhandlung zu den Stoffwechselversuchen verwendeten vier Hunden wurden auch Respirationsversuche angestellt. Sie wurden mit dem *Zuntz-Geppert*-Apparat durchgeführt. Die Hunde waren dabei, abgesehen von den ersten beiden Hungertagen, ruhig; gegen das Ende der Hungerperioden rollten sie sich in typischer Form zusammen, während sie sonst langgestreckt auf der Matratze lagen.

Untersuchungen über den Energieumsatz eines Hundes bei chronischer Unterernährung liegen von *Zuntz* und *Morgulis*[1]) vor. Die Versuche wurden nach dem *Regnault-Reiset*-Prinzip über 24 Stunden durchgeführt. Die Wärmeproduktion betrug bei einem Körpergewicht von 10 kg im nüchternen Zustande vor Beginn der Unterernährung 931 Cal pro 1 qm. Nach einem Gewichtsverlust von 46 Proz. wurden 762 Cal produziert, 4 Wochen später nach 50proz. Gewichtsverlust 630 Cal pro 1 qm. Nach weiteren 8 Wochen wurden wieder zwei Respirationsversuche angestellt. Die Wärmeproduktion ergab im ersten Versuch 849 Cal, im zweiten 921 Cal bei einer Körpertemperatur von 37°. Der Hund ging 3 Wochen nach diesen Versuchen ein. Die Körpertemperatur war auf 35,2° gefallen.

Der Energieverbrauch pro 1 qm Oberfläche sank demnach in jenen Versuchen von einem Anfangswert von 931 Cal bei 10 kg Körper-

---

[1]) *N. Zuntz*, Einfluß chronischer Unterernährung auf den Stoffwechsel Versuch von *Morgulis* und *Diakow*). Diese Zeitschr. 55, 353, 1913.

gewicht bis auf ein Minimum von 630 Cal beim halben Gewicht, um gegen Schluß des Lebens bei 4,1 kg Gewicht wieder auf 921 Cal zu steigen.

Das Sinken der Oxydationsvorgänge steht im Einklang mit manchen Erfahrungen an lange hungernden Menschen. Für diese *prämortale Stoffwechselsteigerung* konnte *Zuntz* keine Erklärung geben, *bringt sie aber*, was ja naheliegt, in *Beziehung zur prämortalen Stickstoffsteigerung.* Es sollte hierin eine spezifisch-dynamische Eiweißwirkung zum Ausdruck kommen. Bei diesen Versuchen wurden keine N-Bestimmungen gemacht, so daß die Erklärung rein hypothetisch ist.

Betrachtet man die Ergebnisse unserer Respirationsversuche (Tabelle I, II, III, IV), so möchte ich vor allem auf die Sauerstoffaufnahme pro 1 qm Oberfläche etwas näher eingehen. Ich habe diese Werte nur zum Teil in Kalorien umgerechnet, weil bei den immer wieder beobachteten niederen Respirationsquotienten, die im Hunger bis 0,57 sanken, der Kalorienwert von 1 Liter Sauerstoff ungenau ist. Diese Werte steigen gegen das Ende der Hungerperioden und mit Beginn des starken Eiweißzerfalls bis auf 0,69 bzw. 0,72 an. Es hat also die stärkere Einbeziehung von Körpereiweiß in den oxydativen Prozeß den niedrigen respiratorischen Quotienten erhöht. Dagegen dürften alle vier Versuche *eindeutig ergeben, daß gerade in den Tagen der prämortalen Stickstoffsteigerung eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs, also auch eine Erhöhung des Stoffwechsels sich nicht bemerkbar macht.* Am vorletzten Tage der Hungerperioden sinkt er bei Hund Bobby und Lotte sogar merklich ab, bei Bello einige Stunden vor dem Tode sogar um 50 Proz. Eine *spezifisch-dynamische Wirkung ist bei der Einschmelzung des Körpereiweißes nicht in Erscheinung getreten.*

Auch im Hinblick auf den Verlauf der erwähnten Versuche von *Zuntz* und Mitarbeiter muß hervorgehoben werden, daß bei unseren Versuchstieren *in der Zeit der Hungerperiode überhaupt ein Wiederanstieg des O_2-Verbrauchs nicht stattfand*, daß dieser *Sauerstoffverbrauch*, auch ohne jenen von *Zuntz* und *Morgulis* angegebenen anfänglichen steilen Abfall, vollkommen *stetig abnahm*[1]), um erst am letzten Tage dann stark abzufallen. Dieser letzte Abfall dürfte durch das präletale Absinken der Körpertemperatur bedingt gewesen sein (z. B. 35^0 bei Hund Bello).

Ein Unterschied in der Sauerstoffaufnahme zwischen den schilddrüsenlosen Hunden und dem Schilddrüsenhund Bobby besteht nicht. Nur der Hund Juno mit Schilddrüse hat einen höheren Verbrauch,

---

[1]) Nur Hund Bobby hat am 3. und 4. Februar zu Beginn der prämortalen Steigerung einen etwas gesteigerten O_2-Verbrauch, der dann wieder am 6. Februar den alten Wert erreicht (Unruhe ?).

was sich aber auch schon in den Respirationsversuchen vor dem Hungerversuch zeigte. Während nämlich die beiden schilddrüsenlosen Hunde „Bello“ und „Lotte“ in der Hungerperiode im Mittel 160 bis 170 Liter aufnehmen, und der Schilddrüsenhund „Bobby“ ebenfalls 170 Liter, beträgt die Aufnahme bei dem Schilddrüsenhund Juno 199 Liter. (Die Mittel wurden derart gezogen, daß die ersten Versuche der Hungertage und ebenso die letzten mit ihren außerordentlich niedrigen Werten nicht mit einbezogen wurden. In den Tabellen sind die zum Mittel genommenen Werte in Spalte 10 kursiv gesetzt.)

Vielleicht macht sich in der *Atemfrequenz* bei schilddrüsenlosen und normalen Tieren ein Unterschied bemerkbar, in dem Sinne, daß bei *den schilddrüsenlosen Hunden eine geringere Zahl von Atemzügen* (4 bis 5) pro Minute gezählt wurde als bei den normalen (5 bis 7).

Die in den Tabellen nicht enthaltenen Atemluftanalysen ergeben

bei Bello	am 23.	4,27	Proz.	CO_2	ohne Schilddrüse
	„ 24.	4,07	„	CO_2	
	„ 29.	4,05	„	CO_2	
	(„ letzten Tag .	2,74	„	CO_2)	
bei Lotte	„ 10.	3,20	„	CO_2	
	„ 12.	3,81	„	CO_2	
	„ 13.	3,68	„	CO_2	
bei Bobby	„ 30. I.	3,40	„	CO_2	mit Schilddrüse
	„ 4. II.	3,23	„	CO_2	
	„ 6. II.	3,5	„	CO_2	
	„ 7. II.	3,12	„	CO_2	
bei Juno	„ 9. III.. . . .	3,8	„	CO_2	
	„ 12. III.. . . .	3,9	„	CO_2	
	„ 13. III.. . . .	4,2	„	CO_2	

Wollte man aus diesen Zahlen auf die alveolare CO_2-Spannung schließen, so würde man, wie ohne weiteres ersichtlich, auch keinen Unterschied zwischen einem schilddrüsenlosen und normalen Hund finden. Bei Juno finden sich Werte, die denen von Bello, und bei Bobby, die denen von Lotte entsprechen.

Zusammenfassung.

Respirationsversuche an zwei schilddrüsenlosen und zwei normalen Hunden im Hungerzustande ergaben einen geringen stetigen Abfall der Stoffwechselintensität bis zum letzten Tage. Erst mit dem mächtigen Absinken der Körpertemperatur (bis 35°) stürzt dann auch die Wärmebildung. Ein Einfluß der beginnenden prämortalen Eiweißeinschmelzung läßt sich an der Sauerstoffaufnahme im Sinne einer Steigerung mit Sicherheit nicht nachweisen.

Tabelle I. Respirationsversuche, angestellt bei einer Zimmertemperatur von 17,6 bis 22°. Hund Bello, ohne Schilddrüse.

Datum 1924	Hungertag	Reduziertes Atemvolumen Liter	Atemfrequenz pro Minute	CO_2-Produktion pro Tier und Minute ccm	O_2-Verbrauch pro Tier und Minute ccm	Respirationsquotient	Kal. pro Tier und 24 Stunden	Kal. pro qm und 24 Stdn. (*Meeh*-Faktor 11,2)	O_2-Verbrauch pro Tier und 24 Stunden Liter	O_2-Verbrauch pro qm und 24 Stunden Liter	Körpergewicht kg
5. XII.		1,240	11	56,6	65,7	0,86	460,8	877,9	94,6	180,0	10,200
1925											
6. I.		0,991	10	43,9	61,6	0,71	416,2	793,2	88,7	171,0	10,000
8. I.		1,350	11	51,8	70,7	0,73	479,5	938,0	101,8	200,0	9,800
9. I.	1.	1,020	11	40,1	61,9	0,65	411,8	843,0	89,1	182,6	9,150
11. I.		1,080	10	37,1	57,5	0,64	—	—	82,8	175,4	8,700
12. I.		1,020	8	40,1	59,3	0,67	396,0	865,0	85,4	187,0	8,300
13. I.		0,894	6	31,5	54,5	0,58	—	—	78,5	*172,0*	8,300
15. I.		0,911	4	32,1	52,6	0,61	—	—	75,7	*165,7*	8,300
16. I.		0,883	5	32,4	56,7	0,57	—	—	81,6	*177,8*	8,350
19. I.	11.	0,829	4	33,4	55,0	0,61	—	—	79,2	*177,6*	8,000
20. I.		0,864	4	34,5	52,3	0,57	—	—	75,3	*171,0*	7,820
21. I.		0,906	4	32,3	48,8	0,66	325,4	744,4	70,2	*167,0*	7,750
23. I.		0,669	4	28,3	43,4	0,66	289,4	676,9	62,5	*146,0*	7,500
24. I.		0,780	4	31,8	45,9	0,69	307,2	724,8	66,1	*156,0*	7,400
26. I.		0,790	4	31,0	45,3	0,68	303,8	735,5	65,2	*158,0*	7,120
27. I.		0,805	4	31,6	46,2	0,68	309,6	759,5	66,5	*162,0*	6,980
30. I.		0,712	4	28,8	38,2	0,75	260,6	675,0	55,0	*141,0*	6,500
31. I.		0,629	4	25,1	32,1	0,78	220,3	575,7	46,2	121,6	6,350
1. II.*)	24.	0,425	4	11,6	16,1	0,72	108,9	290,0	23,2	62,7	6,150

*) Dieser Versuch wurde wenige Stunden vor dem Tode angestellt bei einer Mastdarmtemperatur von 35°.

Tabelle II. Respirationsversuche, angestellt bei einer Zimmertemperatur von 18 bis 22,5°. Hund Bobby, mit Schilddrüse.

Datum 1924	Hungertag	Reduziertes Atemvolumen Liter	Atemfrequenz pro Minute	CO_2-Produktion pro Tier und Minute ccm	O_2-Verbrauch pro Tier und Minute ccm	Respirationsquotient	Kal. pro Tier und 24 Stunden	Kal. pro qm und 24 Stdn. (*Meeh*-Faktor 11,2)	O_2-Verbrauch pro Tier und 24 Stunden Liter	O_2-Verbrauch pro qm und 24 Stunden Liter	Körpergewicht kg
9. XII.		1,360	8	38,6	56,2	0,69	377,3	718,8	81,0	154,0	10,200
16. XII.		1,650	8	48,3	65,6	0,74	446,4	824,7	94,5	174,0	10,680
1925											
11. I.	1.	1,550	9	49,1	79,6	0,62	—	—	114,6	207,0	11,000
13. I.		1,440	10	45,2	73,8	0,61	—	—	106,3	200,5	10,360
19. I.		1,020	9	35,1	56,2	0,62	—	—	81,0	*163,0*	9,400
20. I.		1,070	10	33,8	58,3	0,58	—	—	84,0	*172,0*	9,160
26. I.	16.	1,000	8	33,3	52,0	0,64	—	—	74,9	*163,0*	8,410
3. II.		1,130	8	32,7	55,5	0,59	—	—	80,0	[*193*]*)	7,150
4. II.		1,050	6	33,8	53,0	0,64	—	—	76,3	*187,0*	7,000
6. II.		0,865	5	30,4	45,1	0,67	300,1	782,3	65,0	*166,0*	6,540
7. II.	28.	0,780	5	24,3	34,3	0,71	231,8	605,0	49,0	129,0	6,400

*) Nicht zur Bildung des mittleren Wertes benutzt.

Tabelle III.

Respirationsversuche, angestellt bei einer Zimmertemperatur von 18 bis 23°.
Hund Lotte, ohne Schilddrüse.

Datum 1925	Hungertag	Reduziertes Atemvolumen Liter	Atemfrequenz pro Minute	CO_2-Produktion pro Tier und Minute ccm	O_2-Verbrauch pro Tier und Minute ccm	Respirationsquotient	Kal. pro Tier und 24 Stunden	Kal. pro qm und 24 Stdn. (Oberfl mit *Meeh*-Faktor 11,2)	O_2-Verbrauch pro Tier und 24 Stunden Liter	O_2-Verbrauch pro qm und 24 Stunden Liter	Körpergewicht kg
19. II.		1,300	12	38,2	54,5	0,70	367,2	847,1	78,5	181	7,65
20. II.		1,510	14	42,3	62,6	0,67	419,0	984,1	90,1	212	7,45
1. III.	1.	1,300	11	43,2	65,4	0,66	436,3	1065,8	94,1	230	7,35
2. III.		1,510	14	41,8	55,1	0,76	377,3	874,5	79,3	183	7,60
6. III.		0,986	7	27,8	47,2	0,59	—	—	68,0	187	5,90
9. III.		0,780	6	23,3	42,1	0,55	—	—	60,6	*171*	5,50
10. III.		0,710	5	22,5	37,7	0,59	—	—	54,3	*158*	5,40
12. III.		0,720	5	27,2	39,5	0,69	265,0	811,8	57,0	*174*	5,00
13. III.	13.	0,520	4	19,3	26,8	0,72	181,4	571,3	38,7	122	4,80

Tabelle IV.

Respirationsversuche, angestellt bei einer Zimmertemperatur von 19 bis 23°.
Hund Juno, mit Schilddrüse.

Datum 1925	Hungertag	Reduziertes Atemvolumen Liter	Atemfrequenz pro Minute	CO_2-Produktion pro Tier und Minute ccm	O_2-Verbrauch pro Tier und Minute ccm	Respirationsquotient	Kal. pro Tier und 24 Stunden	Kal. pro qm und 24 Stdn. (*Meeh*-Faktor 11,2)	O_2-Verbrauch pro Tier und 24 Stunden Liter	O_2-Verbrauch pro Tier und 1 qm Oberfl. Liter	Körpergewicht kg
16. II.		1,340	12	43,35	64,4	0,67	430,6	1025,0	92,4	219,6	7,30
20. II.		1,590	12	55,80	71,8	0,78	492,5	1159,0	103,2	242,0	7,40
1. III.	1.	1,570	11	62,60	86,3	0,72	584,6	1398,0	124,0	296,0	7,25
2. III.		1,680	14	56,00	76,3	0,73	518,4	1246,0	110,0	264,0	7,20
3. III.		0,985	8	32,90	52,9	0,62	—	—	76,2	*192,0*	6,70
5. III.	5.	0,914	8	32,60	52,0	0,63	—	—	75,0	*199,0*	6,20
9. III.		0,881	5	32,87	52,8	0,62	—	—	76,1	*216,0*	5,60
12. III.		0,782	6	30,40	44,6	0,68	298,0	888,5	64,0	*189,0*	5,20
13. III.	13.	0,707	5	29,50	43,3	0,68	290,0	891,1	62,3	*191,0*	5,00

Beiträge zur Einwirkung des elektrischen Stromes auf Bakterien.

Von

Martin Schieblich und **Manfred Schulze.**

(Aus dem veterinär-physiologischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 27. November 1925.)

Unter den verschiedenen zur Konservierung grüner Futterpflanzen aller Art dienenden Konservierungsverfahren hat in den letzten Jahren das Elektrofutterverfahren ganz besonderes Interesse erregt und ist vielfach diskutiert worden. Ein Allgemeinurteil über den besonderen Wert dieses Verfahrens liegt auch heute noch nicht vor, und es gibt sowohl begeisterte Anhänger als auch solche, die ihm jedweden Vorteil anderen Konservierungsverfahren gegenüber absprechen. Vom Erfinder des Verfahrens, dem Diplomlandwirt *Schweizer*[1]), wurde sogar behauptet: „Vom Anfang des Stromdurchgangs an kann eine Art Lähmung, eine Unterbindung allen organischen Lebens in der Pflanzenmasse konstatiert werden". Auch heute noch werden immer wieder Stimmen für diese Auffassung laut. Besonders umstritten ist in diesem Rahmen die Frage nach der Einwirkung des elektrischen Stromes auf die mit dem Grünfutter in den Silo eingebrachten Bakterien.

Angenommen, das Gelingen der elektrischen Konservierung beruhe auf einem spezifischen Einfluß des elektrischen Stromes auf diese Bakterien, so wäre auf den ersten Blick der Gedanke bestechend, daß der elektrische Strom eine selektive Wirkung ausübt, derart, daß er die für das Gelingen der Silage erwünschten Bakterien nicht schädigt und die unerwünschten im Wachstum hemmt oder sogar abtötet. Daß die Verhältnisse in Wirklichkeit so außerordentlich günstig liegen sollten, erscheint allerdings von vornherein unwahrscheinlich. Mehr für sich hat der Gedanke, daß der Strom alle Bakterien gleichmäßig hemmt, und daß dann beim Ausschalten des Stromes und damit dem Aufhören des hemmenden Einflusses die Temperaturverhältnisse sich derartig gestaltet haben, daß gerade die erwünschten thermophilen Milchsäurebakterien optimale Wachstumsbedingungen vorfinden,

---

[1]) *Schweizer*, Die Futterkonservierung, S. 26.

während alle anderen unerwünschten Keime durch die hohe Temperatur weiterhin an einer Vermehrung gehindert, ja sogar zum größten Teile abgetötet werden. Wenn dann schließlich die Temperatur wieder sinkt, würde von den inzwischen üppig gewucherten Milchsäurebakterien so viel Milchsäure gebildet worden sein, daß nun diese ihrerseits bei niederer Temperatur, bei der auch unerwünschte Keime zur Entwicklung kommen können, deren Wachstum unmöglich macht. Die elektrische Konservierung würde also dann auf drei zeitlich aufeinanderfolgenden und durch einander bedingten Faktoren beruhen.

Die Untersuchungen, die von *Scheunert* und einem von uns [*Schieblich*[1])] über die quantitative Bewegung der Bakterienflora im Elektrosilo während der Konservierung angestellt wurden, ließen nun allerdings erkennen, daß von einer Lähmung oder gar Abtötung der Bakterien durch den elektrischen Strom keine Rede sein kann. Es findet im Gegenteil zunächst infolge Ansteigens der Temperatur eine starke Vermehrung der Keime statt, die allerdings späterhin von einer Abnahme gefolgt wird, und dies unter Umständen schon bei Temperaturen, die für bakterielles Leben noch günstig sind. Die genannten Verfasser führten die Ursache dieses Rückgangs auf die Bildung von Milchsäure durch Milchsäurebakterien und den Eintritt anaerober Verhältnisse zurück, wodurch viele der ursprünglich vorhandenen Bakterien am weiteren Wachstum verhindert und schließlich zum Absterben gebracht werden. Es ist hier jedoch auch nicht außer acht zu lassen, daß ein Teil der in den Silo eingebrachten Bakterien bereits gegen Temperaturen empfindlich ist, die über 30° gelegen sind. Daß diese Überlegungen richtig waren, konnten die genannten Verfasser neuerdings stützen. Bei einem Versuch mit einer neueren Modifikation des Elektrofutterverfahrens, dem Elfu-Grubenverfahren mit Elektrodenstäben, wurde zunächst Hand in Hand mit dem Temperaturanstieg während des Stromdurchgangs ein Ansteigen der Keimzahl im Futterstock festgestellt. Nach Unterbrechung des Stromdurchgangs und, wie es dieses Verfahren ermöglicht, Verwendung der Elektrodenstäbe als Heizstäbe wurde aber dieselbe Abnahme der Keimzahl beobachtet, wie in der früheren Untersuchung. Eine Wirkung des elektrischen Stromes kam hierbei als Ursache also nicht in Frage[2]).

[1]) *Scheunert* und *Schieblich*, Über die bei der elektrischen Futterkonservierung ablaufenden Vorgänge. Ill. Landw. Ztg., Jahrg. 43, Nr. 8, 1923.

[2]) *Scheunert* und *Schieblich*, Über die bakteriologischen Vorgänge bei der Silofutterbereitung. Tagesfragen der Futtermittelversorgung, dargestellt auf Veranlassung des Reichsministeriums für Ernährung und Landwirtschaft 1925, S. 86.

Im übrigen entspricht diese gegenüber einer spezifischen Wirkung des elektrischen Stromes ablehnende Haltung den früheren Befunden bakteriologischer Autoren. Insbesondere hatten die in vitro in einwandfreier Weise durchgeführten Versuche von *Thiele* und *Wolf*[1]) über die Einwirkung des elektrischen Stromes auf Bakterien ein negatives Ergebnis. Sie konnten direkt dartun, daß bei einer Stromdichte von 0,2 bis 0,3 Amp./cm^2 weder Gleich- noch Wechselstrom, wenn Elektrolyse sowie thermische Einflüsse vermieden wurden, schädlich auf Bakterien einwirken.

Nach Abschluß unserer Versuche erschien eine Arbeit von *Kleiber*[2]), der Untersuchungen über die Einwirkung des elektrischen Stromes auf *Hefe* anstellte. Er kommt zu dem Ergebnis, daß im Elektrosilo nicht mit einer Abtötung der Mikroflora gerechnet werden kann und glaubt, daß die Mikroorganismen durch ihre schlecht leitende Membran vor dem Einfluß des Stromes geschützt werden, was um so stärker hervortritt, je kleiner die Organismen sind. Bei Gärung unter Wechselstrom mit 3 bis 4 Volt . cm^{-1} Spannungsgefälle und 7 bis 8 Milliampere pro Quadratzentimeter Stromdichte wurde die Gärung nicht gehemmt. Die mit Gleichstrom von demselben Ausmaß beobachtete Beeinträchtigung der Gärung war nicht auf eine spezifisch elektrische Wirkung zurückzuführen, sondern konnte einwandfrei in einer Veränderung des Gärmediums nachgewiesen werden, wodurch dieses nicht nur die Gärfähigkeit verliert, sondern auch die Hefezellen abgetötet werden.

Bei der großen wirtschaftlichen Bedeutung der Silagefrage erschien uns eine nochmalige Prüfung der Einwirkung des elektrischen Stromes auf Bakterien geboten, jedoch *unter Verhältnissen, die den im Elektrosilo herrschenden möglichst angepaßt waren.*

Ob in der Arbeit von *Thiele* und *Wolf* (l. c.) diese Verhältnisse getroffen sind, läßt sich nicht ohne weiteres entscheiden, da die Angabe des Spannungsgefälles fehlt, unter dem das Versuchsmedium in der Tat gestanden hat. Die Angabe der Netzspannung bei diesen Versuchen genügt nicht, da sich die tatsächlich wirksame Spannung und damit der Stromdurchfluß durch den Widerstand, wie er auch durch einen Nährboden für Bakterien beispielsweise gebildet wird, ergibt und erstere wohl kaum dem Wert der Netzspannung entsprochen haben dürfte. Das Spannungsgefälle im Versuchsgefäß ist gleich der Spannungsdifferenz zwischen den beiden Elektroden zu setzen, wenn auch, auf den gesamten Stromkreis bezogen, in der Tat nur ein Teil der gesamten

---

[1]) *Thiele* und *Wolf*, Über die Einwirkung des elektrischen Stromes auf Bakterien. Centralbl. f. Bakt. usw., I. Abtl., **25**, 650, 1899.

[2]) *Kleiber*, Beitrag zur Frage der Einwirkung elektrischer Ströme auf Mikroorganismen. Diese Zeitschr. **160**, 312 bis 324, 1925.

Netzspannung zur Überbrückung dieses Widerstands gebraucht wird. Für unsere Betrachtungen kommt aber nur diese „Klemmspannung" des Versuchsgefäßes in Frage. Die von *Kinzel* und *Kuchler*[1]) bei Anwendung hochgespannter Ströme, eventuell bei sehr hoher Periodenzahl, und nur geringer Stromstärke (Induktionsströme) gemachte Beobachtung einer deutlich bakteriziden Wirkung läßt sich, wie sie auch selbst bemerken, nicht ohne weiteres auf den Elektrosilo übertragen, weil hier andere Ströme bei einem anderen Verhältnis e/i in Frage kommen. Auch bei der praktischen Elektrofutterbereitung ist der Quotient e/i zwar nicht konstant, da der Widerstand der vom Strom durchflossenen Futtermasse mit fortschreitender Konservierung und ansteigender Temperatur geringer wird, aber bei einer praktisch stets gleichbleibenden Spannung von meist 220 Volt liegt der Wert des Quotienten in gewissen Grenzen, da die Stromstärken sich zwischen 5 und 50 Ampere in geregelter Folge bewegen. Aus der insgesamt zugeführten Energiemenge, sowie aus dem zeitlichen Verlauf der Elektrokonservierung läßt sich für i ein mittlerer Wert berechnen bzw. annehmen, der in der Mehrzahl der Fälle zwischen 35 und 40 Ampere liegt. Wesentliche Abweichungen hiervon, sei es nach oben, sei es nach unten, bedingen natürlich ganz andere Verhältnisse in bezug auf die in der Zeiteinheit zugeführten Energieintensitäten, und bis heute spricht nichts dafür, daß die Wirkungen in diesen Fällen notwendig immer gleich sind. Das Maß für die Energiemengen pro Einheit war also für unsere Versuche durch die gegebenen Bedingungen des Großsilos bestimmt. So war bei der Größe und Form der Versuchungsgefäße, in denen wir die Bakterien wachsen ließen, mit einer Stromstärke von etwa 0,2 Ampere im Mittel zu rechnen. Je nach Art der Nährlösung hatten wir 0,12 bis 0,26 Ampere Stromdurchgang, alles Energieintensitäten, die den verschiedenen im Silo herrschenden Stromstärken unter Bezugnahme auf Elektrodenoberfläche und Elektrodenabstand gerecht wurden. Die sich hieraus ergebende Stromdichte entsprach beim Großsilo (13 bis 14 qm Grundfläche) einem Stromdurchgang von 38 bis 39 Ampere. Der zur Verfügung stehende Wechselstrom von 220 Volt und 6 Ampere Nennstromstärke mußte durch geeignete Widerstände auf rund 0,2 Ampere herabgemindert, ferner auch so weit herabgespannt werden, daß das an den Elektroden im Versuchsgefäß vorhandene Spannungsgefälle (= die Spannung unseres Versuches) dem Quotienten e/i denselben Wert verlieh, wie es unter äquivalenten Bedingungen im Großsilo der Fall ist.

---

[1]) *Kinzel* und *Kuchler*, Die Silofrage mit besonderer Berücksichtigung des Elektrosilos im Lichte neuer Forschung. Prakt. Blätter der Bayr. Landesanstalt für Pflanzenbau u. Pflanzenschutz, Jahrg. 1923, Heft 6/7.

In den Stromkreis wurde also ein starker Flüssigkeitswiderstand und zur feineren Einstellung ein Regulierwiderstand eingeschaltet. Der Flüssigkeitswiderstand hatte als Elektroden blanke Kupferplatten und als Elektrolyt eine sehr stark verdünnte Salzlösung. Bedenken, daß hierbei eine teilweise Gleichrichtung des Wechselstroms erfolgen könnte, die natürlich geeignet wäre, andere Versuchsergebnisse als bei Verwendung von reinem Wechselstrom zu liefern, konnten dadurch einwandfrei widerlegt werden, daß die Klemmspannung des Flüssigkeitswiderstands mit einem Voltmeter gemessen wurde, das nur auf Gleichstrom ansprach und eine genügende Empfindlichkeit besaß. Als das Voltmeter keinen Ausschlag zeigte, war bewiesen, daß es sich um reinen Wechselstrom handelte, eine Gleichrichtung mithin nicht zu befürchten war. Ferner wurde in den Stromkreis ein Amperemeter eingeschaltet. Das Voltmeter wurde direkt an die Elektroden des Versuchsgefäßes angelegt. Als Versuchsgefäß dienten Kolben von 1000 ccm Inhalt. Die Elektroden bestanden aus Platindraht, der spiralig-tellerförmig gewickelt war.

Der Abstand der Elektroden war ebenfalls nicht willkürlich. Im Elektrosilo wird bekanntlich nicht eine beliebige, sondern eine innerhalb enger Grenzen bestimmte Schichthöhe jedesmalig unter Strom gesetzt, so daß das Spannungsgefälle pro Längeneinheit hierdurch ebenfalls bestimmt ist. Es ergab sich für unsere Versuche ein senkrechter Elektrodenabstand von 10 cm, nur bei Versuch VII 8,5 cm. Die Spannung betrug 8,4 (Temperatur der verwandten Nährlösungen etwa 37°) bis 12,5 Volt (Zimmertemperatur), nur in einem Falle (Versuch IV) wurde bei Anwendung eines anderen Nährmediums eine Spannung von 15,5 bis 20 Volt beobachtet. Der Quotient e/i entspricht also nicht mathematisch genau dem oben geforderten, nähert sich ihm aber weit mehr wie der bei bisherigen Versuchen angegebene bzw. zu vermutende. Eine Regulierung der Klemmspannung des Versuchsgefäßes wäre auch nur möglich gewesen durch Veränderung des inneren Widerstands der Nährlösung, die an und für sich durchaus im Bereich der Möglichkeit gelegen hätte. Da dies aber nur zu erreichen gewesen wäre, indem die Ionenkonzentration verändert wurde, haben wir davon Abstand genommen, da keinerlei Einflüsse, die sich eventuell auf die Bakterien hätten erstrecken können, hereingebracht werden sollten.

Zu den Untersuchungen wurden Bakterien benutzt, die in Silagen bzw. auf dem frischen dazu verwandten Ausgangsmaterial häufig angetroffen werden, und zwar 1. „*Lange*“ *Milchsäurebakterien*, 2. *Bacillus vulgatus* (*Flügge*) *Migula*, 3. *Bacillus amylobacter van Tieghem*, 4. *Bacterium punctatum* (*Zimmermann*) *Lehm. et Neum.* und 5. *Bacterium asteriforme Klecki.* Die beiden letzteren wurden vornehmlich auch

ihrer außerordentlich gut ausgeprägten Beweglichkeit halber benutzt, da ja die Beweglichkeit eine Eigenschaft ist, die bei schädigender Einwirkung des elektrischen Stromes sehr bald verschwinden müßte.

1. Versuch.

Zwei Kolben mit je 1 Liter steriler Traubenzuckerbouillon ($p_H = 7{,}2$) wurden mit je 1 ccm einer gut bewachsenen Traubenzuckerbouillonkultur von *„Langen" Milchsäurebakterien* beimpft. Der Stamm war aus einem Elektrofutter des Versuchsgutes Oberholz der Universität Leipzig gezüchtet. Die Kolben wurden im Brutschrank bei 37° gehalten, und durch den einen wurde elektrischer Strom geschickt, während der andere zur Kontrolle diente. Die Temperatur hielt sich in dem elektrisierten Kolben durchschnittlich um 1° höher als im Kontrollkolben. Nach 18 und nach 42 Stunden wurden Keimzählungen vorgenommen. Nach 18 Stunden ließ sich äußerlich ein Unterschied in der Bewachsung der Kolben nicht feststellen; beide erschienen gleichmäßig getrübt. Die Zählung ergab denn auch in beiden Kolben fast gleiche Zahlen, und zwar betrug sie im Kolben mit Strom 235 000 000, im Kontrollkolben 231 000 000 pro 1 ccm. Nach 42 Stunden zeigten die beiden Kolben ebenfalls ein ganz gleichmäßiges Verhalten, insofern, als sich die Nährlösung fast völlig geklärt hatte und ein kräftiger Bodensatz zur Ausbildung gelangt war. Die Zählung ergab nach sorgfältigem, längerem Umschütteln zwecks gleichmäßiger Verteilung des Niederschlags hier allerdings einen immerhin beachtlichen Unterschied. Die Keimzahl im Kolben mit Strom belief sich diesmal auf 203 000 000, die im Kontrollkolben auf 297 000 000 „Lange" Milchsäurebakterien pro 1 ccm. Hinsichtlich der gebildeten Säure war allerdings praktisch kein Unterschied festzustellen. So wurden für den elektrisierten Kolben, der in Zukunft mit E bezeichnet werden soll, 3,591 Proz., für den Kontrollkolben, der weiterhin als K bezeichnet werden soll, 3,582 Proz. Säure ermittelt. (Diese Zahlen liegen vielleicht etwas hoch, da sie nicht mit Hilfe der Tüpfelmethode, sondern durch Titrieren der vorgelegten farbigen Lösung bis zum Farbumschlag gewonnen wurden. Ihr Vergleichswert bleibt davon natürlich unberührt.)

2. Versuch.

Da in diesem ersten Versuch also scheinbar, wenigstens den Keimzahlen nach, ein hemmender Einfluß des elektrischen Stromes festzustellen war, wurde der Versuch wiederholt, um Zufallsergebnisse auszuschalten. Die Impfmenge wurde diesmal absichtlich kleiner gewählt, um eventuell hemmende Wirkungen des Stromes besser zur Auswirkung gelangen zu lassen, und zwar wurden zwei Ösen einer einen Tag alten Agarkultur desselben Stammes von „Langen" Milchsäurebakterien in 9 ccm sterilen Wassers aufgeschwemmt und hiervon je 1 ccm in zwei Kolben mit je 1 Liter steriler Traubenzuckerbouillon ($p_H = 7{,}2$) gebracht. Die Kolben wurden wieder bei 37° im Thermostaten gehalten. Die Versuchsdauer betrug diesmal 49 Stunden. Die Temperatur lag in E wieder durchschnittlich 1° höher als in K. Es wurden wieder zwei Keimzählungen, und zwar nach 24 und 49 Stunden, vorgenommen. Nach 24 Stunden erschien der Kolben mit Strom stärker getrübt, eine Beobachtung, die auch durch die ermittelten Keimzahlen bestätigt wurde. So betrug die Keimzahl in E 176 700 000,

in K 120000000 pro 1 ccm. Nach 49 Stunden boten die Kolben ein gleichmäßiges Bild; in beiden hatte sich die Nährlösung geklärt und sich ein kräftiger Bodensatz gebildet. Die ermittelten Keimzahlen verhielten sich wieder ähnlich zueinander wie im ersten Versuch, insofern als die Keimzahl in E etwas niedriger war. Sie betrug 133300000 gegenüber 200000000 in K. Die gebildete Säure hingegen war praktisch wieder gleich, sie betrug in E 3,599 Proz. und in K 3,596 Proz.

Aus den in diesen beiden Versuchen ermittelten Keimzahlen könnte man geneigt sein, auf eine hemmende Wirkung des elektrischen Stromes auf das Bakterienwachstum in der zweiten Hälfte des Versuchs zu schließen, wenn nicht die zum Schluß gefundenen Säuremengen die gleichen gewesen wären. Dieser scheinbare Widerspruch zwischen Keimzahl und Säuremenge läßt sich aber zwanglos aus dem zwischen E und K bestehenden Temperaturunterschied erklären. Die Temperatur von 38° in E lag dem Temperaturoptimum der benutzten „Langen" Milchsäurebakterien scheinbar näher als die Temperatur von 37° in K, wodurch das Wachstum in E etwas rascher voranging. Hierfür sprechen auch die Keimzahlen nach 24 Stunden, die in beiden Fällen in E etwas höher lagen. Dadurch, daß aber die Vermehrung der Bakterien in E rascher vor sich ging, mußte naturgemäß hier auch der Zeitpunkt früher erreicht sein, zu dem die Bakterien durch ihre eigenen Ausscheidungsstoffe und wohl auch durch Nahrungsmangel geschädigt wurden, und so eine rückläufige Bewegung einsetzen, d. h. die Zahl der lebensfähigen Keime sinken.

3. Versuch.

In diesem Versuch wurde das Hauptaugenmerk darauf gerichtet, die oben genannten störenden Temperaturunterschiede auszuschalten, was auch dadurch einwandfrei gelang, daß der Kontrollkolben in einen um 1° höher eingestellten Thermostaten gebracht wurde als der Kolben mit Strom. Zwei Kolben mit je 1 Liter steriler Traubenzuckerbouillon (p_H = 7,2) wurden wiederum mit dem aus dem Elektrofutter Oberholz isolierten Stamme von „*Langen*" *Milchsäurebakterien* beimpft, und zwar in der Weise, daß zehn Ösen einer gut bewachsenen Traubenzuckerbouillonkultur in 9 ccm sterilen Wassers aufgeschwemmt wurden und hiervon in jeden Kolben 1 ccm gebracht wurde. E wurde diesmal bei 39°, K bei 40° gehalten, durch den Stromdurchgang kam ersterer bald auch auf 40°. Die Temperatur wurde deshalb so gewählt, weil das Temperaturoptimum des benutzten Stammes von „Langen" Milchsäurebakterien etwa bei dieser Temperatur lag. Der Versuch wurde 48 Stunden lang fortgeführt, und es gelang, was nochmals betont sei, die Temperatur in beiden Kolben dauernd auf gleicher Höhe zu halten. Nach 24 Stunden war E leicht getrübt, K hingegen kaum verändert. Die Keimzählung ergab entsprechend in E 159200000, in K 83970000 pro 1 ccm Nährlösung. Nach Ablauf von 48 Stunden war E gerade im Begriff, sich zu klären, K gut getrübt. Beim Umschütteln trübte sich E aber bedeutend stärker. E hatte also offenbar den Höhepunkt des Bakterienwachstums gerade überschritten, während ihn K noch nicht

erreicht hatte. Die Keimzahlen wie auch die Säuremengen bestätigten diese Vermutung. Die Keimzahl betrug nämlich in *E* 990000000, in *K* 413000000; die Säuremenge im ersteren 2,862, im letzteren 2,304 Proz. (Tüpfelmethode).

Dieser Versuch hat scheinbar auf den ersten Blick zu einem anderen Ergebnis geführt als die beiden ersten, da hier die Keimzahl in *E* bedeutend höher liegt. Dem ist aber in Wirklichkeit nicht so, sondern der Versuch ist nur zu einem anderen Zeitpunkt unterbrochen worden. Hätte man ihn noch länger fortlaufen lassen, so wäre man zu demselben Ergebnis gelangt, wie in den beiden vorherigen Versuchen, denn der Vorsprung in der Bakterienentwicklung ist auch hier wieder in *E* unverkennbar. Während *E* bereits begann, sich zu klären, also den Höhepunkt der Bakterienentwicklung bereits überschritten hatte, war *K* noch in vollem Wachstum begriffen. Hätte man die Zählung vorgenommen, nachdem sich auch der Kontrollkolben geklärt hatte, wäre die Keimzahl in *E* wieder kleiner gewesen, da die Absterbevorgänge in diesem dann weitere Fortschritte als in *K* gemacht gehabt hätten. Der Versuch bestätigt also die oben ausgesprochene Vermutung, daß die Ergebnisse der beiden ersten Versuche nicht als schädigende Stromwirkung zu deuten, sondern einem anderen Faktor zuzuschreiben sind. Da nun in diesem Versuche die etwaige, das Wachstum in *E* fördernde, höher liegende Temperatur ausgeschaltet worden ist und trotzdem ein ähnlicher Effekt erzielt wurde, muß angenommen werden, daß noch ein anderer wachstumsfördernder Faktor zugegen gewesen sein muß, der dann nur in einer wachstumsfördernden Reizwirkung des elektrischen Stromes auf die Bakterien zu suchen sein kann. Die Ergebnisse dieser drei Versuche lassen sich damit kurz dahin zusammenfassen, daß elektrische Ströme, wie sie bei der Elektrosilierung in Anwendung gelangen, auf „Lange" Milchsäurebakterien nicht nur nicht hemmend, sondern sogar wachstumsfördernd einwirken.

4. Versuch.

Zwei Kolben mit je 1 Liter steriler Krautbrühe (10 g Pepton, 250 g Weißkraut, 20 g Traubenzucker, Aqua dest. zu 1000, $p_H = 5{,}9$) wurden mit je 1 ccm einer gut gewachsenen Krautbrühekultur des *Bacillus amylobacter van Tieghem (Bacillus saccharobutyricus mobilis non liquefaciens Graßberger und Schattenfroh, Clostridium butyricum Prazmowsky, Bacillus saccharobutyricus v. Klecki)* beimpft. Die beiden Kolben wurden dann mit einem Gäraufsatz versehen, anaerob verschlossen und in einen Thermostaten von 37° gebracht. Die Versuchsdauer betrug 90 Stunden, die Temperatur lag hier in *E* dauernd 2 bis 3° höher als in *K*. Von irgendwelcher Hemmung des Wachstums der Buttersäurebazillen war nichts zu bemerken, im Gegenteil trat die Gärung in dem Kolben mit Strom bedeutend früher ein, als im Kontrollkolben, kam dafür aber natürlich wieder eher zum Abschluß. Nach 90 Stunden war die Gärung in *E* beendet. Die Nährflüssigkeit

hatte sich geklärt, und es war ein kräftiger Bodensatz zur Ausbildung gelangt. Dasselbe Bild bot auch *K*, allerdings stiegen hier noch wenige Blasen auf. Daß der Umfang der Gärung in den beiden Kolben derselbe war, dafür sprechen wiederum die zum Schluß ermittelten Säuremengen. So wurden in *E* 0,456, in *K* 0,468 Proz. Säure festgestellt.

5. Versuch.

In diesem Versuch wurde die Einwirkung des elektrischen Stromes auf das *Bacterium punctatum (Zimmermann) Lehm. et Neum.* geprüft und hier neben Keimzählungen hauptsächlich Wert auf Beobachtungen etwa eintretender Unterschiede in dem Grade der Beweglichkeit der Bakterien in den beiden Kolben gelegt. Als Nährlösung diente diesmal gewöhnliche Nährbouillon (p_H = 7,2). Zwei Kolben mit je 1 Liter des genannten Nährbodens wurden mit je 1 ccm einer 100fachen Verdünnung einer gut gewachsenen Traubenzuckerbouillonkultur von Bacterium punctatum beimpft. *E* wurde diesmal bei Zimmertemperatur, *K* in einem Thermostaten gehalten, dessen Temperatur nach Möglichkeit immer der Temperatur von *E* anzupassen versucht wurde. Die Temperatur in *E* schwankte zwischen 27 und 29,1°, in *K* zwischen 24,2 und 28,6°. Sie lag also in *K* durchschnittlich etwas tiefer. Keimzählungen wurden vorgenommen nach 20 und nach 66 Stunden. Nach 20 Stunden betrug die Keimzahl in *E* 290000000, in *K* 363000000, nach 66 Stunden 530000000 bzw. 500000000. Prüfungen auf Beweglichkeit der Bakterien in den beiden Kolben wurden nach 20, 24, 42, 48, 66 und nach 72 Stunden vorgenommen. Während nach 20 Stunden die Bakterien in *E* eine entschieden lebhaftere Bewegung als in *K* zeigten, war diese nach 42 Stunden in *K* etwas größer. Bei den übrigen Prüfungen konnten keine Unterschiede konstatiert werden.

Wenn in diesem Versuch auch keine direkt fördernde Einwirkung des elektrischen Stromes auf das Bakterienwachstum zutage tritt, so ist doch für irgendwelche ungünstige Beeinflussung der Bakterien keinerlei Anzeichen vorhanden.

6. Versuch.

Der hier geprüfte Organismus, das *Bacterium asteriforme Klecki*, gehört zur Gruppe des Bacterium Zopfii Kurth. Es wurde außer seiner guten Beweglichkeit halber auch deshalb gewählt, um zu sehen, ob etwa Keime aus der Gruppe der Fäulniserreger ein anderes Verhalten zeigten. Außer Keimzählungen wurden wieder öftere Prüfungen der Beweglichkeit der Bakterien vorgenommen. Zwei Kolben mit je 1 Liter steriler Nährbouillon (p_H = 7,2) wurden mit je 1 ccm einer Aufschwemmung von zwei Ösen einer gut gewachsenen Agarkultur des genannten Bakteriums in 9 ccm sterilen Wassers beimpft. Die Kolben wurden in derselben Weise gehalten, wie im Versuch 5. Die Temperatur schwankte während des 72stündigen Versuchs in *E* zwischen 26 und 30,8°, in *K* zwischen 27 und 28,8°. Die Temperatur von 30,8° wurde in *E* nur vorübergehend auf kurze Zeit erreicht, im allgemeinen lagen die Temperaturen in beiden Kolben dicht beieinander, oft war sie sogar in *K* höher. Keimzählungen wurden nach 24 und 72 Stunden vorgenommen und ergaben in *E* 1457000 bzw. 8240000, in *K* 1370000 bzw. 2280000. Der ganz bedeutende Unterschied in der Keimzahl machte sich schon bei der Betrachtung der Kultur im hängenden Tropfen bemerkbar:

es waren hierbei in E deutlich mehr Bakterien vorhanden, während zur Zeit der ersten Zählung im hängenden Tropfen Mengenunterschiede nicht wahrnehmbar waren. Nach 24 Stunden waren beide Kolben leicht getrübt, und in beiden waren gut bewegliche Stäbchen vorhanden; auch nach 48 Stunden waren in beiden gleich viel gut bewegliche Stäbchen sichtbar. Anders war das Bild nach 72 Stunden; diesmal waren, wie schon erwähnt, im hängenden Tropfen aus E entschieden mehr und auch lebhafter bewegliche Stäbchen als aus K zugegen.

Dieser Versuch bestätigt also wieder die Vermutung, daß die verwandten elektrischen Ströme eher anregend als hindernd auf das Bakterienwachstum einwirken. Direkt beweisend fiel in dieser Hinsicht der folgende letzte Versuch aus.

7. Versuch.

Als Versuchsobjekt diente diesmal der fast in keiner Silage fehlende, zur Gruppe der Erdbazillen gehörende *Bacillus vulgatus (Flügge) Migula.* Zwei Kolben mit je ¾ Liter Nährbouillon ($p_H = 7{,}2$) wurden mit je 1 ccm einer homogenen Aufschwemmung von Bacillus vulgatus in sterilem Wasser beimpft und beide Kolben in einen Brutschrank von 36°, diesmal aber, um die Temperatur unbedingt auf gleicher Höhe zu halten, in ein Wasserbad gebracht. Der Erfolg blieb nicht aus, es gelang in der Tat, die Kolben während der ganzen Versuchsdauer von 120 Stunden auf gleicher Temperatur zu halten; sie schwankten beide gleichmäßig zwischen 35 und 36°. Nach 45 Stunden war eine Haut auf der Nährlösung zur Ausbildung gelangt, in E aber unverkennbar deutlicher als in K. In diesem Bilde änderte sich bis zum Schlusse nichts, die Hautbildung schritt in E dauernd besser fort, und nach 120 Stunden war in E eine deutlich dickere Haut als in K entstanden. Die Häute wurden dann verlustlos gesammelt und ihre Trockensubstanz bestimmt. Diese betrug für E 0,3610 g, für K 0,1749 g, die Trockensubstanz der Haut in E betrug demnach 0,1861 g mehr als in K. Eine Prüfung der Beweglichkeit der Bazillen nach 120 Stunden ergab reichlich sehr gut bewegliche Stäbchen in E.

Da in diesem Versuch wie in Versuch III Temperaturunterschiede völlig ausgeschaltet waren, ist *der Beweis für die Richtigkeit der Vermutung, daß die verwandten Ströme nicht schädigend, sondern im Gegenteil fördernd auf das Wachstum der Bakterien einwirken, einwandfrei erbracht.* Es sei hier nicht unerwähnt gelassen, daß auch *Kinzel* und *Kuchler* (l. c., S. 195), allerdings mit ganz anderen Strömen, eine Förderung des Bakterienwachstums wahrnehmen konnten.

Dieser fördernden Wirkung der im Elektrosilo verwandten Ströme auf die Entwicklung der Bakterien kann bei einer exakt durchgeführten Elektrosilierung, bei der die erwünschte Temperatur von etwa 50° in möglichst kurzer Zeit erreicht wird, ein gewisser Nutzen nicht abgesprochen werden, da die „Langen“ Milchsäurebakterien auch gegen Ende der Konservierung bei ihnen noch förderlichen, dem größten Teile der anderen vorhandenen Bakterien aber längst schädlichen Tem-

peraturen noch weiter dieser wachstumsanregenden Wirkung des Stromes unterliegen und so eine absolut vorherrschende Stellung erlangen können, ehe wieder auch für unerwünschte Bakterien günstige Temperaturen eintreten. In Fällen, in denen die Temperatur von 50° nicht rasch erreicht wird, muß die beobachtete Stromwirkung allerdings verhängnisvolle Folgen haben, da dann die ursprünglich in der Überzahl vorhandenen unerwünschten Keime besonders üppig wuchern und ihre verderblichen Wirkungen voll entfalten können, ehe sie durch Temperatur und Milchsäure gehemmt werden.

Die Elektrotitration in physiologischen Flüssigkeiten.

II. Mitteilung: Die Bestimmung von Eisen.

Von

Ernst Mislowitzer und Werner Schaefer.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 28. November 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Bei dem Eintauchen einer Platinelektrode in eine Ferri-Ferrosalzlösung entsteht an der Elektrode eine bestimmte Ladung. Sie wird durch folgende Formel ausgedrückt:

$$E = A + 0{,}058 \log \frac{c\,Fe^{\cdot\cdot\cdot}}{c\,Fe^{\cdot\cdot}} \text{ Volt (bei } 20^0\text{)}.$$

In dieser Formel ist A eine Konstante, das sogenannte Normalpotential des elektromotorisch wirksamen Vorganges. Das Normalpotential gilt für den speziellen Fall, daß in der Lösung die Konzentration c der verschiedenen Oxydationsstufen gleich eins ist; es ist von der Wahl der Bezugselektrode abhängig. Werden in einer Lösung Ferroionen zu Ferriionen oder Ferriionen zu Ferroionen, so ändert sich das Elektrodenpotential E. Diese Änderung ist nicht groß, wenn in der Lösung noch ein Gemisch von Ferri- und Ferroionen übrig bleibt, sie ist aber sehr erheblich, wenn eine Oxydationsstufe völlig verschwindet oder soeben entsteht. Der Endpunkt der Reaktion $Fe^{\cdot\cdot} + F = Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ oder $Fe^{\cdot\cdot\cdot} - F = Fe^{\cdot\cdot}$ läßt sich daher an dem Auftreten einer plötzlichen Potentialänderung, eines Potentialsprunges erkennen. Die Menge Ferroeisen, die in einer Lösung ist, wird mit Hilfe eines Oxydationsmittels elektrometrisch titriert, die Menge Ferrieisen mit Hilfe eines Reduktionsmittels. Der Potentialsprung ist jedesmal der Indikator für die Beendigung der Reaktion. Dasselbe gilt für andere Oxydationen, z. B. für $Ti^{\cdot\cdot\cdot} + F = Ti^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$.

Die elektromotorische Titration wurde zur Eisenbestimmung schon mehrfach angegeben. Als Oxydantien dienten Bichromat, Bromat und Permanganat[1]).

[1]) Siehe *E. Müller*, Die elektrometrische Maßanalyse. Dresden, Steinkopf, 1923.

Neuerdings beschrieb *Tomiček*[1]) die direkte Titration von Ferrieisen mit Hilfe von Titantrichlorid als Reduktionsmittel und zugleich Titrationsflüssigkeit.

Wir wollen im folgenden Untersuchungen über die elektrometrische Bestimmung von Eisen unter Benutzung von Titantrichlorid als Reduktionsmittel und Bromat als Maßflüssigkeit mitteilen analog der Titration von Kupfer[2]). Eine ähnliche Bestimmungsform kann in den Untersuchungen von *Kolthoff*[3]) über den Eisengehalt der Titanlösung gesehen werden. *Kolthoff* benutzte aber Bichromat und berechnete die Eisenmenge wie bei dem Kupfer aus der Menge Bichromat, die zwischen den beiden Potentialsprüngen verbraucht wurden.

Die Titration zerfällt in drei Vorgänge. Zunächst wird durch Zugabe einer überschüssigen Menge von Titantrichlorid alles Ferrieisen zu Ferroeisen reduziert; dabei wird die äquivalente Menge Titantrichlorid zu Titantetrachlorid. Dann wird durch Zufügen von Bromat zunächst das überschüssige Titantrichlorid und im Anschluß daran das zweiwertige Eisen oxydiert.

I. $Ti^{\cdot\cdot\cdot} + Fe^{\cdot\cdot\cdot} = Ti^{\cdot\cdot\cdot\cdot} + Fe^{\cdot\cdot}$

II. a) $Ti^{\cdot\cdot\cdot} + F = Ti^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$

b) $BrO_3' + 6\,H^{\cdot} + 6\,Ti^{\cdot\cdot\cdot} = Br' + 3\,H_2O + 6\,Ti^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$

III. a) $Fe^{\cdot\cdot} + F = Fe^{\cdot\cdot\cdot}$

b) $BrO_3' + 6\,H^{\cdot} + 6\,Fe^{\cdot\cdot} = Br' + 3\,H_2O + 6\,Fe^{\cdot\cdot\cdot}$

Auf diese Weise läßt sich die *Summe* des ursprünglich vorhandenen Ferro- und Ferrieisens titrieren; dem Eisen entspricht diejenige Bromatmenge, die zwischen den beiden am Ende der Titan- und am Ende der Eisenoxydation auftretenden Potentialsprüngen verbraucht wird.

Zur Feststellung des Potentialsprunges werden im Laufe der Titration mit Bromat fortwährend die Potentialdifferenzen zwischen der Platinelektrode in der Eisenlösung und einer beliebigen Bezugselektrode gemessen. Die Änderungen der Potentialdifferenzen werden — auf die Einheit der Maßflüssigkeit bezogen — immer größer und erreichen schließlich einen sehr großen Wert, um danach wieder abzufallen. Der maximale Wert der Änderungen ist der „Potentialsprung".

Eine zweite Titrationsmethode ist weit einfacher: Da zwischen der Bezugselektrode und der Platinelektrode am Endpunkt der Titration ein ganz bestimmtes Potential herrscht, braucht nur so lange titriert

---

[1]) *Tomiček*, The application of titanous chloride to potentiometric titrations. IV. Estimation of oxydising cations. Recueil des travaux chim. des Pays-Bas **43**, Nr. 9/10, S. 798 bis 807, 1924.

[2]) Siehe Fußnote auf voriger Seite.

[3]) *Kolthoff* and *Tomičet*, II. Purity, preparation and standardisation of the titration liquid. Recueil des travaux chim. des Pays-Bas **43**, 775 bis 783, 1924.

zu werden, bis dieses Potential erreicht ist. Hierbei werden also nicht mehr die einzelnen Potentialdifferenzen gemessen.

Für unsere Messungen benutzten wir das in dieser Zeitschrift beschriebene Potentiometer[1]) und als Bezugselektrode die gesättigte Kalomelelektrode. Die Verbindung der beiden Elektrodenflüssigkeiten wurde mit einem Agarröhrchen über eine mit gesättigter KCl-Lösung gefüllte Wanne hergestellt. Als Ableitungselektrode diente uns die zur Ausrüstung der Becherglaselektrode[2]) gehörende, in einen Glasstab eingeschmolzene Platinelektrode.

Übersicht.

I. Bestimmung von anorganischem Eisen.
   A. Titration von Fe¨
   B. Titration von Ti˙˙˙
   C. Titration von Fe˙˙˙ nach Reduktion durch Ti˙˙˙

II. Bestimmung von Eisen in organischer Bindung oder in physiologischen Lösungen.
   A. Feuchte Veraschung.
   B. Trockene Veraschung.

I. *A. Titrationen von Fe¨ mit* BrO'_3.

Titration von 2 ccm n/100 Ferro mit n/100 Bromat.

Bromat ccm	Brückenzahlen in Ohm	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$ Wachstum in Ohm oder Millivolt (a) bezogen auf 0,1 ccm Bromat	Bromat ccm	Brückenzahlen in Ohm	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$ Wachstum in Ohm oder Millivolt (a) bezogen auf 0,1 ccm Bromat
0	156	—	1,6	239	5
0,2	181	—	1,8	250	5,5
0,4	192	—	1,9	260	10
0,6	202	—	2,0	277	17
0,8	209	—	2,1	438	61 Maximum
1,0	216	—	2,2	453	15
1,2	222	3	2,3	457	4
1,4	229	3,5			

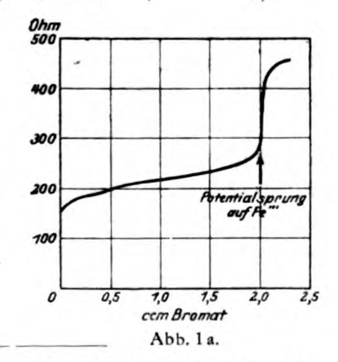


Abb. 1 a.

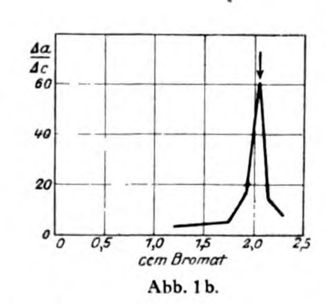


Abb. 1 b.

[1]) *E. Mislowitzer*, diese Zeitschr. **159**, 69.
[2]) Ebendaselbst **159**, 72.

Titration von 0,94 ccm n/100 Ferro mit n/400 Bromat.

Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$	Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$
0	315	—	3,3	495	7
1,5	428	—	3,4	510	15
2,0	475	—	3,5	530	20
2,2	445	—	3,6	555	25
2,4	450	—	3,65	Sprung auf 700	
2,6	457	—		sofort zurück	
2,8	465	—		auf 560	
3,0	475	—	3,70	730	175
3,1	480	—	3,74	830	250 Maximum
3,2	488	—	3,78	850	50

Titrationsergebnis 3,74 ccm. Theoretischer Wert 3,76 ccm.

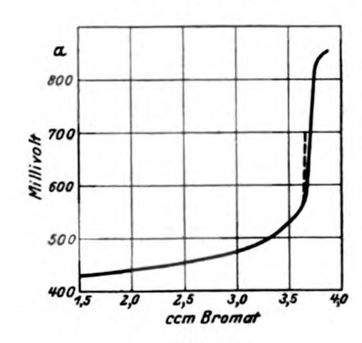


Abb. 2a.

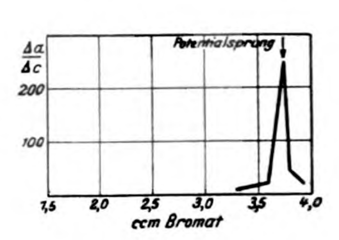


Abb. 2b.

Die auf der Kurve gestrichelt gezeichnete Linie deutet einen dem Potentialsprung unmittelbar vorausgehenden, sofort wieder zurückgehenden Potentialsprung, einen sogenannten „Vorsprung" an.

Der Punkt, an dem die Oxydation des zwei- zum dreiwertigen Eisen beendet ist, läßt sich rechnerisch und experimentell finden. Wir sahen, daß die Titration beendet ist, wenn sich das Potential zwischen der Platinelektrode und der gesättigten Kalomelelektrode einige Zeit über 800 Millivolt hält. Diese Feststellung ermöglicht die zweite Titrationsart, bei der nicht mehr die einzelnen Potentiale nach jedesmaligem Zufügen von Maßflüssigkeit bestimmt werden, sondern so lange titriert wird, bis das bekannte, im Endpunkt der Titration herrschende Potential von 800 Millivolt überschritten ist. Stellt man daher die Brücke auf 800 Millivolt ein, so wird man durch einen Zeigerausschlag *nach rechts* erkennen, daß das Potential noch nicht erreicht ist, durch einen Zeigerausschlag *nach links*, daß es überschritten ist. Es muß also bei feststehender Brückenstellung von 800 Millivolt so lange Bromatlösung hinzugefügt werden, bis der Zeiger des Meßinstruments beim Schließen des Stromkreises nach links ausschlägt. Aus der angeführten Kurve ist zu ersehen, daß

der Punkt 800 schon vor der wirklichen Beendigung der Titration erreicht oder auch schon überschritten wird. Beim Umschütteln geht aber die Spannung sofort wieder zurück. Es ist daher notwendig, sich an eine bestimmte Arbeitsweise zu gewöhnen. Arbeitet man mit Bromatlösungen, die nicht verdünnter als n/100 sind, so wird man die Titration als beendet ansehen dürfen, wenn nach dreimaligem Schütteln von einigen Sekunden Dauer das Potential für eine Minute über 800 bleibt, d. h. der Zeiger nach der gleichen Zeit deutlich nach links geht.

Bei den sehr verdünnten Bromatlösungen von n/400 bis n/800 nimmt die Elektrode unmittelbar nach dem Schütteln ein zu hohes Potential an, daher ist es bei Titrationen mit diesen Lösungen erforderlich, nach dem Schütteln eine Zeitlang zu warten, dann erst einzuschalten und den Ausschlag zu beobachten. Da diese Vorsicht ja nur in nächster Nähe des Umschlagspunktes nötig ist, bedeutet sie keine wesentliche Verlangsamung der Titration.

Wir haben uns bei allen unseren Versuchen genauestens an folgende Vorschrift gehalten: Zeigten die schwächer werdenden Ausschläge, daß die Titration ihrem Ende zugeht, so haben wir nach jedesmaligem Zufügen von 1 bis 2 Tropfen umgeschüttelt, 15 Sekunden gewartet und den Ausschlag beobachtet. Ging er nach 15 Sekunden nach links, so haben wir nochmals 15 Sekunden gewartet, wieder eingeschaltet und die Titration für beendet angesehen, wenn der Zeiger auch nach diesen zweiten 15 Sekunden nach links ausschlug. Eine solche Titration ist hier gemeint, wenn von „*Titration auf Sprung*" die Rede ist.

Bei der Titration auf den Titansprung braucht man nicht so vorsichtig vorzugehen, da die für Titan verbrauchte Bromatmenge für die Berechnung nicht in Frage kommt. Ein Teil des Titans wird beim Schütteln auch durch den Sauerstoff der Luft oxydiert; das ist aber bedeutungslos. Die ersten ausführlich durchgeführten Titrationen zeigten, daß die Titanoxydation beendigt ist, wenn das Potential von 330 Millivolt deutlich überschritten ist. Zur Titanoxydation wird daher die Brücke auf 330 Millivolt gestellt, und es wird so lange titriert, bis der Zeiger des Meßinstruments nach links ausschlägt. Eine solche Titration heißt hier „Titration auf Titansprung".

Auf „Sprung" sind die folgenden Bestimmungen titriert.

0,94 ccm n/200 Ferro mit n/400 Bromat titriert.

1. 3,75 2. 3,75

Das heißt, es wurden genau dieselben Werte, wie bei der Titration mit Messung der einzelnen Potentiale gefunden, s. Abb. 2.

1 ccm n/100 Ferro mit n/100 Bromat titriert.

1. 2,02 2. 2,03 3. 2,03 4. 1,99 5. 1,97 6. 1,97

1 ccm n/100 Ferro mit n/400 Bromat titriert.

1. 3,95 2. 3,99 3. 3,97 4. 3,93 5. 3,97 6. 3,95

B. Titrationen von $Ti^{\cdots}$ mit BrO_3'.

1 ccm Titanochlorid (15prom.) — 1 ccm HCl mit n 400 Bromat titriert.

Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$	Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$
2,0	190	—	3,47	400	35
3,0	250	—	3,55	490	120
3,2	260	—	3,61	570	150
3,3	300	40	3,65	700	300
3,35	320	40	3,69	840	330 Maximum
3,40	370	100 Maximum	3,74	850	20

Berechnung des Eisengehalts:

$$\begin{array}{r} 3{,}69 \\ -\,3{,}40 \\ \hline 0{,}29 \end{array}$$

0,29 ccm n 400 Bromat = 0,030[6] mg Fe.

1 ccm n/100 Bromat = 1 ccm n 100 Fe = 0,56 mg Fe.

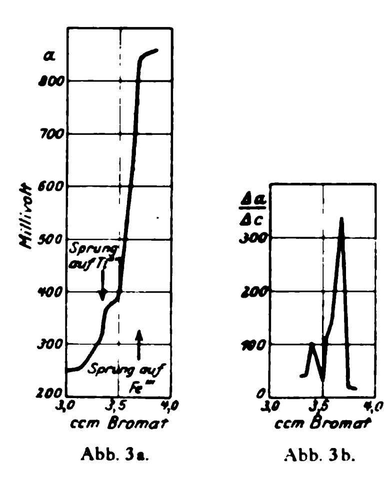


Abb. 3a. Abb. 3b.

Da die Titanlösung Eisen enthält, geht der Sprung nicht von 320 Millivolt direkt auf 800, sondern über eine Zwischenzone, deren Breite den Gehalt an Eisen wiedergibt.

Die Titration des Eisengehalts der Titanlösung vereinfacht sich sehr, wenn auf „Doppelsprung" titriert wird. Hierbei wird zuerst die Brücke auf 330 Millivolt eingestellt und Bromat zugetropft, bis der Titansprung vorüber ist; dann wird auf 800 Millivolt eingestellt und bis zum zweiten Sprung titriert. Die zwischen den beiden Sprüngen abgelesenen Kubikzentimeter Bromat entsprechen dem Eisengehalt der Titanlösung.

Titrationen auf Doppelsprung.

1. 0,25 ccm n/400 Bromat . . . . . = 0,035 mg Fe
2. 0,25 „ n/400 „ . . . . . = 0,035 „ Fe
3. 0,27 „ n/400 „ . . . . . = 0,0378 „ Fe
4. 0,31 „ n/400 „ . . . . . = 0,0434 „ Fe
5. 0,28 „ n/400 „ . . . . . = 0,0392 „ Fe
6. 0,28 „ n/400 „ . . . . . = 0,0392 „ Fe

C. Titrationen von Ferri nach Reduktion durch Titanochlorid.

Es zeigte sich, daß die Reduktion der Ferrisalzlösungen durch Titan nur in der Hitze quantitativ erfolgt. Die eingetretene Reduktion erkennt man daran, daß die Lösung farblos geworden ist. Es wurde in stark salzsaurer Lösung titriert, da in dieser die Ausschläge am deutlichsten sind (siehe *Müller*, l. c.).

1 ccm n/10 Ferri + 2 ccm HCl + 2 ccm Titan (15prom.) mit n/10 Bromat titriert.

Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$	Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$
0,45	200	—	1,0	430	—
0,48	260	—	1,2	450	—
0,51	295	120	1,4	490	—
0,54	345	160 Maximum	1,5	515	25
0,57	360	50	1,55	560	90
0,61	370	—	1,59	830	670 Maximum
0,64	380	—	1,62	855	90
0,8	405	—	1,65	870	50

Berechnung des Eisengehalts:

1,59
— 0,54

1,05 ccm Bromat für Eisen und Titanblindwert.
— 0,06

0,99 ccm Eisengehalt.

Theoretisch: 1,00 ccm n/10 Fe. Gefunden: 0,99 ccm n/10 Fe.

1 ccm n/100 Ferri + 1 ccm HCl + 2 ccm Titan (15prom.) mit n/100 Bromat titriert.

Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$	Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$
0,4	170	—	1,5	470	—
0,5	190	20	1,6	480	—
0,6	240	50	1,65	490	20
0,69	345	115	1,70	500	20
0,76	370	35 Maximum	1,75	540	80
0,90	400	20	1,80	600	120
1,0	410	—	1,85	840	480 Maximum
1,1	425	—	1,90	880	70
1,2	435	—	1,95	890	20
1,4	460	—			

Berechnung des Eisengehalts:

1,85
— 0,69

1,16 ccm Bromat für Eisen + Titanblindwert.
— 0,16 „ Blindwert für 2 ccm Titan.

1,00 ccm Eisengehalt.

Theoretisch: 1,00 ccm n/100 Fe. Gefunden: 1,00 ccm n/100 Fe.

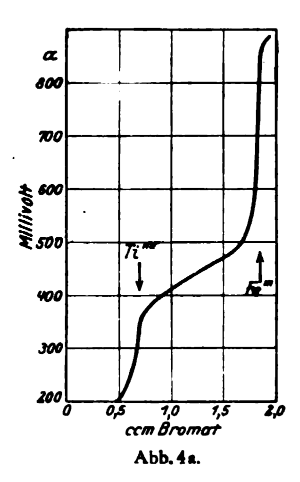


Abb. 4a.

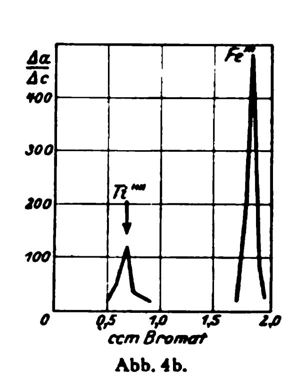


Abb. 4b.

1 ccm n/400 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan (15prom.) mit n/400 Bromat titriert.

Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$	Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$
1,4	170	—	3,0	445	—
1,6	185	—	3,1	460	—
1,8	210	—	3,2	465	—
2,0	235	—	3,3	480	—
2,2	260	7,5	3,4	495	15
2,32	275	13	3,47	510	20
2,44	350	60 Maximum	3,58	550	80
2,50	370	35	3,63	660	160
2,60	395	15	3,68	750	180
2,70	410	—	3,70	810	300 Maximum
2,80	420	—	3,75	850	50
2,90	430	—	3,80	880	60

Berechnung des Eisengehalts:

3,70
— 2,44

1,26 ccm Bromat für Eisen + Blindwert.
— 0,28 „ Blindwert (s. bei Titantitration).

0,98 ccm Eisengehalt.

Theoretisch: 1,00 ccm n/400 Fe. Gefunden: 0,98 ccm n/400 Fe.

Titrationen auf „Doppelsprung“ mit **n/400 Bromat.**

Blindwerte der Titanlösung (1 ccm 15prom.).

1. 0,21 ccm n/400 Bromat   4. 0,23 ccm n/400 Bromat
2. 0,20 „ n/400 „   5. 0,22 „ n/400 „
3. 0,24 „ n/400 „   6. 0,20 „ n/400 „

Mittel 0,22 ccm n/400 Bromat = 0,0308 mg Fe.

3 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 1,70 ccm n/400 Bromat   2. 1,72 ccm n/400 Bromat

Theoretischer Wert 1,72 ccm.

2,5 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 1,48 ccm n/400 Bromat   2. 1,49 ccm n/400 Bromat

Theoretischer Wert 1,47 ccm.

2,0 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 1,20 ccm n/400 Bromat   3. 1,22 ccm n/400 Bromat
2. 1,21 „ n/400 „   4. 1,22 „ n/400 „

Theoretischer Wert 1,22 ccm.

1,5 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 0,99 ccm n/400 Bromat   3. 0,96 ccm n/400 Bromat
2. 0,95 „ n/400 „   4. 0,95 „ n/400 „

Theoretischer Wert 0,97 ccm.

1 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 0,71 ccm n/400 Bromat   4. 0,70 ccm n/400 Bromat
2. 0,69 „ n/400 „   5. 0,73 „ n/400 „
3. 0,74 „ n/400 „

Theoretischer Wert 0,72 ccm = 0,070 mg Fe.

0,9 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 0,68 ccm n/400 Bromat   2. 0,67 ccm n/400 Bromat

Theoretischer Wert 0,67 ccm = 0,063 mg Fe.

0,8 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 0,61 ccm n/400 Bromat   2. 0,60 ccm n/400 Bromat

Theoretischer Wert 0,62 ccm = 0,056 mg Fe.

0,7 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 0,56 ccm n/400 Bromat   2. 0,57 ccm n/400 Bromat

Theoretischer Wert 0,57 ccm = 0,049 mg Fe.

0,6 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 0,52 ccm n/400 Bromat   2. 0,49 ccm n/400 Bromat

Theoretischer Wert 0,52 ccm = 0,042 mg Fe.

0,5 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 0,50 ccm n/400 Bromat   3. 0,46 ccm n/400 Bromat
2. 0,49 „ n/400 „   4. 0,43 „ n/400 „

Theoretischer Wert 0,47 ccm = 0,035 mg Fe.

Titrationen mit **n/800 Bromat.**

Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$	Bromat ccm	Millivolt	$\frac{\Delta a}{\Delta c}$
3,0	220	—	4,8	385	5
3,6	240	—	5,0	400	—
4,0	260	—	5,2	430	—
4,2	270	5	5,6	455	6
4,4	315	22	5,8	490	17
4,46	325	15	6,0	580	45
4,51	335	20	6,1	650	70
4,54	350	45 Maximum	6,2	740	90
4,59	360	20	**6,25**	830	180 Maximum
4,7	370	8	6,30	870	80

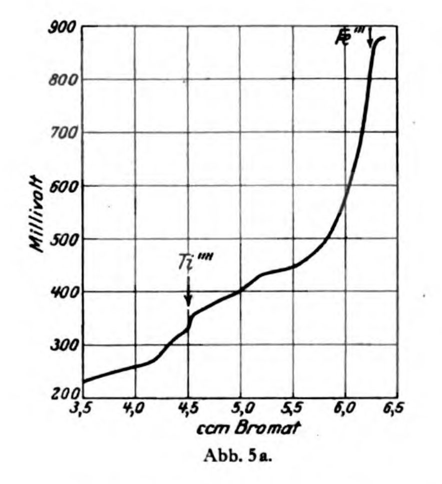


Abb. 5a.

Berechnung des Eisengehalts:

$$\begin{array}{r} 6{,}25 \\ -\,4{,}54 \\ \hline 1{,}71 \end{array}$$

1,71 ccm Bromat für Eisen + Blindwert.

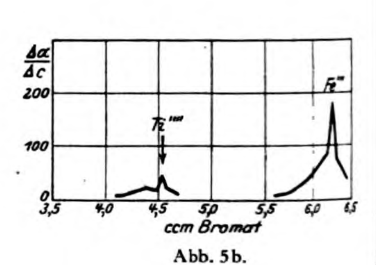


Abb. 5b.

Wie man aus der Kurve ersieht, sind die Sprünge bei Benutzung von n/800 Bromat nicht mehr so deutlich, wie bei stärkeren Bromatlösungen. Jedoch lassen sich auch hier gute Resultate erhalten, wenn man auf Doppelsprung titriert, wie aus den folgenden Titrationen ersichtlich ist. Bei diesen starken Verdünnungen ist es besonders notwendig, sich streng an ein gleichmäßiges Titrieren zu gewöhnen.

Titrationen mit n/800 Bromat auf Doppelsprung.

Es wurde etwa dreitropfenweise mit jedesmaligem kurzen, nicht zu starkem Schütteln titriert. Brückenstellung zuerst auf 330 Millivolt. Nach Erreichung dieses Punktes wurde die Brücke auf 500 Millivolt gestellt. War dieser Punkt überschritten, so wurde nur noch tropfenweise titriert. Blieb das Potential nach Schütteln noch zweimal 15 Sekunden über 800 Millivolt, so war die Titration beendet.

Blindwert der Titanlösung.

1. 0,60 ccm n/800 Bromat		3. 0,59 ccm n/800 Bromat
2. 0,58 „ n/800 „		4. 0,60 „ n/800 „

Mittel 0,59 ccm n/800 Bromat.

1 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 1,53 ccm n/800 Bromat	3. 1,60 ccm n/800 Bromat
2. 1,57 „ n/800 „	4. 1,54 „ n/800 „

Theoretischer Wert 1,59 ccm.

0,9 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 1,52 ccm n/800 Bromat	2. 1,45 ccm n/800 Bromat

Theoretischer Wert 1,49 ccm.

0,4 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 1,00 ccm n/800 Bromat	3. 1,00 ccm n/800 Bromat
2. 1,02 „ n/800 „	4. 0,95 „ n/800 „

Theoretischer Wert 0,99 ccm = 0,028 mg Fe.

0,3 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 0,86 ccm n/800 Bromat	3. 0,83 ccm n/800 Bromat
2. 0,87 „ n/800 „	4. 0,88 „ n/800 „

Theoretischer Wert 0,89 ccm = 0,021 mg Fe.

0,2 ccm n/800 Ferri + 1 ccm HCl + 1 ccm Titan.

1. 0,79 ccm n/800 Bromat	3. 0,73 ccm n/800 Bromat
2. 0,76 „ n/800 „	4. 0,84 „ n/800 „

Theoretischer Wert 0,79 ccm = 0,014 mg Fe.

Die hiermit einer titrimetrischen Bestimmung zugängliche Eisenmenge, die in 0,2 ccm n/800 Ferrilösung enthalten ist, *beträgt 0,014 mg Fe.* Da es gelingt, den Leerwert noch weiter zu verringern, so läßt sich wohl auch eine Titration von 0,01 mg und noch etwas weniger ermöglichen. Die Befreiung der Titanlösung vom Eisengehalt siehe bei *Kolthoff* [1]).

II. *A. Feuchte Veraschung.*

Sie wurde auf folgende Weise versucht. Eisen-Serummischungen[2]) und reine Eisenlösungen wurden mit Schwefel- und Salpetersäure nach *Neumann* verascht und die klare Lösung in ein Becherglas überspült. Darauf wurde längere Zeit gekocht und mit Titan reduziert. Die Reduktion war oft unvollständig und die Einstellung der Potentiale bei der Titration erfolgte so träge, daß sich keine brauchbaren Werte erhalten ließen.

---

[1]) *Kolthoff* und *Tomiček*, The application of titanous chloride to potentiometric titrations. II. Purity preparation and standardition of the titration liquid. Recueil des travaux chim. des Pays-Bas 43, 775 bis 783, 1924.

[2]) 1 ccm Serum + 1 ccm n/100 Ferrichloridlösung wurde vermischt, so daß die Lösung n/200 war.

B. Trockene Veraschung.

1. Ohne Zusatz von Alkali.

Eisen-Serummischungen und reine Eisenlösungen wurden im Quarz- oder Porzellantiegel durch einfaches Glühen über der Flamme des Bunsenbrenners verascht. Dabei zeigte sich, daß Eisen verloren ging. Besonders deutlich wurde der Verlust beim Glühen über dem Gebläse. In den Fällen, in denen, um einen Verlust beim Glühen zu vermeiden, schwächer geglüht wurde und sich noch Kohleteilchen zeigten, war die Menge an verbrauchtem Bromat im Verhältnis zur Eisenmenge zu groß. Ein Versuch mit gewöhnlicher Eisenlösung, bei dem nach der Reduktion durch Titan Knochenkohle zugefügt wurde, ergab, daß Kohle das überschüssige Titanchlorid oxydierte und bei der Titration Bromat band. Es folgt daraus, daß die Veraschung vollständig durchgeführt sein muß.

Blättchenmethode.

Versuche, das Blut nach Aufsaugung in Blättchen, wie sie bei der *Bang*schen Methode üblich sind, zu veraschen, führten nicht zum Ziele. Die Blättchen hatten einen zu hohen und nicht konstanten Eisenblindwert. Auch nach mehrtägiger Reinigung der Blättchen mit Salzsäure und Aqua dest. gingen die Blindwerte nicht wesentlich herunter. Auch aschefreie Filter waren ungeeignet.

2. Veraschung mit Zusatz von Natronlauge oder Kalilauge.

Es wurde vor der Veraschung das Eisen mit 2 bis 3 Tropfen etwa 10proz. Natronlauge gefällt. Bei vorsichtigem Glühen im Quarztiegel konnten richtige Resultate erhalten werden, während beim starken Glühen große Verluste eintraten. Der Quarztiegel wird durch die geringe Menge der Natronlauge bald aufgelockert und nach kurzer Zeit unbrauchbar.

Auch der *Platintiegel* ist für die Veraschung ungeeignet. Zunächst war es schwer, das Eisenoxyd aus dem Platintiegel vollständig zu entfernen, da es trotz Vermeidung von zu starkem Glühen sehr fest am Boden haftete. Außerdem traten häufig Titrationsstörungen auf, deren Ursache nicht aufgeklärt werden konnte.

Im *Porzellantiegel* wurden nach der Veraschung mit Natronlauge viel zu hohe Eisenwerte gefunden. Der Fehler stammt zum größten Teil aus Eisen, das beim Glühen mit fixem Alkali von dem Porzellantiegel abgegeben wird. Unsere Versuche ließen das mit Bestimmtheit erkennen.

Veraschung mit Zusatz von Ammoniak.

Aus diesem Grunde wurde die Natronlauge als Fällungsmittel verworfen und zu Ammoniak übergegangen. Damit waren die Schwierig-

keiten behoben. Die Bestimmungen wurden nunmehr in folgender Weise vorgenommen:

Die zu untersuchende Flüssigkeit wird im Porzellantiegel mit 0,2 ccm Ammoniak (wir benutzten die 25proz. Lösung „zur Analyse“ von *Kahlbaum*) versetzt, auf dem Bunsenbrenner vorsichtig eingedampft und verkohlt. Darauf wird nochmals 0,2 ccm Ammoniak zugefügt, erhitzt und in dem auf schwache Rotglut gebrachten „Tiegelofen mit Einsatz“ (*Heraeus*, Hanau) die Veraschung vorgenommen. Auf peinliche Sauberkeit, besonders Vermeidung von metallhaltigen Instrumenten beim Anfassen des Tiegels ist zu achten. Sobald die letzten Kohleteilchen verschwunden sind, wird der Tiegel aus dem Ofen entfernt und abgekühlt. Darauf werden 2 ccm konzentrierte Salzsäure und etwa 1 ccm Aqua dest. hinzugefügt und das Ganze erwärmt, wobei eine völlige Lösung der Asche eintritt. Die Lösung wird in ein Becherglas übergegossen, der Tiegel nochmals mit 1 ccm Aqua dest. versetzt, erwärmt und ebenfalls in das Becherglas entleert. Nunmehr wird die Lösung im Becher zum Sieden erhitzt und mit einer der Eisenmenge ungefähr entsprechenden Titanchloridlösung reduziert, abgekühlt und dann mit Kaliumbromat titriert. Die Titration erfolgt in der bei der Titration einfacher Eisenlösungen angegebenen Weise.

Die Titration in der noch heißen Lösung ist unsicher, weil in der Hitze die Agarröhrchen ausgelaugt werden und austretender Agar Bromat verbrauchen kann.

Titrationen von n/200 Ferri-Serummischung auf Doppelsprung mit n/400 Bromat.

Blindwert 0,28.

0,8 ccm n/200 Ferri-Serummischung + 2 ccm HCl + Titan.
1. 1,81 ccm n/400 Bromat   2. 1,91 ccm n/400 Bromat
Theoretischer Wert 1,88 ccm.

0,7 ccm n/200 Ferri-Serummischung + 2 ccm HCl + Titan.
1. 1,66 ccm n/400 Bromat   3. 1,73 ccm n/400 Bromat
2. 1,75 „ n/400 „
Theoretischer Wert 1,68 ccm.

0,6 ccm n/200 Ferri-Serummischung + 2 ccm HCl + Titan.
1. 1,46 ccm n/400 Bromat   3. 1,48 ccm n/400 Bromat
2. 1,45 „ n/400 „
Theoretischer Wert 1,48 ccm.

0,5 ccm n/200 Ferri-Serummischung + 2 ccm HCl + Titan.
1. 1,32 ccm n/400 Bromat   3. 1,30 ccm n/400 Bromat
2. 1,30 „ n/400 „   4. 1,24 „ n/400 „
Theoretischer Wert 1,28 ccm = 0,14 mg Fe.

0,4 ccm n/200 Ferri-Serummischung + 2 ccm HCl + Titan.
1. 1,06 ccm n/400 Bromat   3. 1,09 ccm n/400 Bromat
2. 1,09 „ n/400 „
Theoretischer Wert 1,08 ccm = 0,112 mg Fe.

0,3 ccm n/200 Ferri-Serummischung + 2 ccm HCl + Titan.

1. 0,90 ccm n/400 Bromat
2. 0,90 „ n/400 „
3. 0,88 ccm n/400 Bromat
4. 0,85 „ n/400 „

Theoretischer Wert 0,88 ccm = 0,084 mg Fe.

0,2 ccm n/200 Ferri-Serummischung + 2 ccm HCl + Titan.

1. 0,73 ccm n/400 Bromat
2. 0,64 „ n/400 „
3. 0,71 „ n/400 „
4. 0,68 ccm n/400 Bromat
5. 0,71 „ n/400 „
6. 0,70 „ n/400 „

Theoretischer Wert 0,68 ccm = 0,056 mg Fe.

Bestimmung des Eisens im Blut.

Die Bestimmungen wurden genau wie bei Eisen-Serummischungen ausgeführt. Die theoretischen Werte wurden aus der in 0,2 ccm Blut gefundenen Menge abzüglich des Blindwertes für die übrigen Blutmengen berechnet. Es wurde mit n/400 Bromat titriert.

0,72 ccm n/400 Bromat
— 0,28 „ n/400 „
0,44 für 0,2 ccm Blut oder
0,22 „ 0,1 „ „

Blindwert 0,28 ccm n/400 Bromat.

0,2 ccm Blut.

1. 0,74 ccm n/400 Bromat
2. 0,71 „ n/400 „
3. 0,72 „ n/400 „
4. 0,74 ccm n/400 Bromat
5. 0,72 „ n/400 „
6. 0,67 „ n/400 „

Mittel 0,72 ccm n/400 Bromat.

0,3 ccm Blut.

1. 0,93 ccm n/400 Bromat
2. 0,87 „ n/400 „
3. 0,92 ccm n/400 Bromat
4. 0,87 „ n/400 „

Theoretischer Wert 0,66 ccm n/400 Bromat
+ 0,28 „ n/400 „
0,94 ccm n/400 Bromat

0,4 ccm Blut.

1. 1,15 ccm n/400 Bromat
2. 1,15 „ n/400 „
3. 1,18 ccm n/400 Bromat

Theoretischer Wert 0,88 ccm n/400 Bromat
+ 0,28 „ n/400 „
1,16 ccm n/400 Bromat

0,5 ccm Blut.

1. 1,33 ccm n/400 Bromat
2. 1,38 „ n/400 „
3. 1,33 ccm n/400 Bromat
4. 1,35 „ n/400 „

Theoretischer Wert 1,10 ccm n/400 Bromat
+ 0,28 „ n/400 „
1,38 ccm n/400 Bromat

Die Elektrotitration in physiologischen Flüssigkeiten.

III. Mitteilung:

Eine neue Zuckerbestimmungsmethode.

Von

Ernst Mislowitzer.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 28. November 1925.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Das bei der Reduktion aus dem Kupfersulfat gebildete Cuprooxyd wird in der *Bertrand*schen Methode über das Ferri- und Ferroeisen mit Permanganat titriert[1]). Bei der ursprünglichen Methode und auch allen bisherigen Abänderungen[2]) wird das Cu_2O aus der Reduktionsflüssigkeit durch Abfiltrieren oder Abzentrifugieren entfernt. Diese Isolierung *muß* geschehen, weil sich Ferroeisen nicht in Gegenwart von einer organischen Substanz, in diesem Falle von weinsaurem Natrium, mit Permanganat titrieren läßt.

Wählt man zur Oxydation des Ferroeisens Bromat und nimmt man an Stelle des weinsauren das zitronensaure Salz, so läßt sich die Titration ohne weiteres in der mit Ferrieisen versetzten und angesäuerten Reduktionsflüssigkeit ausführen. Eine *Abtrennung des* Cu_2O *erübrigt sich* nunmehr.

Das Ende der Titration wird bei der Anwendung von Permanganat an dem Auftreten des rosa Farbtones erkannt. Bei der Oxydation des Ferroeisens durch Bromat erscheint keine charakteristische Farbe. Somit kann als Indikator nur der am Ende der Oxydation auftretende Potentialsprung dienen.

---

[1]) Siehe *Bertrand*, Bull. de la Soc. Chim. de France **35**, 1285, 1906; *Sontag*, diese Zeitschr. **58**.

[2]) *Möckel* und *Frank*, Hoppe-Seyler **65**, 323, 1910; *L. Michaelis*, diese Zeitschr. **59**, 166, 1914.

Die elektrometrische Bestimmung von Ferroeisen, auf die, wie ersichtlich, die Zuckerbestimmung hinausläuft, ist in der vorhergehenden Arbeit ausführlich besprochen worden. Der Endpunkt der Oxydation wird durch die vereinfachte Titration auf „Sprung“ aufgesucht und sehr leicht gefunden.

Wie in der vorhergehenden Arbeit schon gesagt, werden nicht die einzelnen Potentialdifferenzen nach jedem Zusatz von Maßflüssigkeit gemessen und die Unterschiede miteinander verglichen, sondern es wird bei fester Brückenstellung so lange titriert, bis der Zeiger des Meßinstruments nicht mehr nach rechts, sondern deutlich nach links ausschlägt. So ausgeführt, ist die elektrometrische Titration nicht viel schwieriger als eine Titration unter Benutzung von Farbindikatoren.

Übersicht über das Prinzip der Methode.

1. Oxydation der Glucose in einer Lösung von Kupfersulfat, Natriumhydrat und zitronensaurem Natrium.
2. Direkte Oxydation *(ohne Isolierung)* des gebildeten Cu_2O durch Ferrieisen in salzsaurer Lösung.
3. Titration des entstandenen Ferroeisens mit Hilfe von Bromat unter Verwendung des Potentialsprungs als Indikator.

Die Ausführung der Methode erfolgt in drei Abschnitten, welche sind:

1. Die Reduktion.
2. Der Umsatz Cupro-ferri zu Cupri-ferro.
3. Die elektrometrische Titration.

Die Methode ist als Mikro- und Halbmikromethode ausgearbeitet.

1. Die *Reduktion* geschieht bei der Mikromethode in Jenaer Bechern von 50 ccm Inhalt, 6,7 cm Höhe und 3,5 cm äußerer Durchmesser am Boden (schlanke Form), bei der Halbmikromethode in Jenaer Bechergläsern von 50 ccm Inhalt (Normaltyp). Die Becher werden auf einem Asbestdrahtnetz über freier Flamme stark erhitzt, so daß die Flüssigkeit nach 1½ bis 2 Minuten ins Sieden kommt. Dann wird die Flamme klein gestellt, ein Uhrglas auf den Becher gelegt und die Flüssigkeit *genau* 3 Minuten in einem schwachen, aber deutlichem Sieden gehalten. 3 bis 4 Glaskapillaren sind zur Vermeidung des Siedeverzugs in den Becher hineinzustellen. Nach Beendigung der Reduktion wird das Uhrglas entfernt und der Becher in ein etwas größeres mit Wasser gefülltes Gefäß gestellt. Die Abkühlung ist schnell erreicht, und es kann nunmehr die Umsetzung von Kupfer und Eisen erfolgen.

2. Zu diesem Zwecke wird der Reduktionsflüssigkeit eine *Salzsäure-Eisenlösung* hinzupipettiert. Durch die Neutralisation hat sich die Flüssigkeit wieder erwärmt, kühlt sich aber in 2 bis 3 Minuten beim Stehen oder in ½ Minute beim Kühlen in Wasser wieder auf

Zimmertemperatur ab. (Die Siedekapillaren werden erst nach beendeter Bromattitration aus dem Becher herausgenommen.)

3. In den Becher wird eine Platinelektrode und ein elektrolytischer Stromschlüssel oder ein Agarröhrchen gestellt. Das andere Ende des Agarröhrchens führt in eine mit KCl-Lösung gefüllte Wanne, in die eine gesättigte Kalomelelektrode eintaucht. Als Platinelektrode eignet sich ein Platindraht, der am Ende etwas Platinblech trägt. Bequemer ist es mit den in Glasröhren eingeschmolzenen Platinelektroden zu arbeiten, die zur Ausrüstung der Becherglaselektrode (siehe diese Zeitschr. **159**, 72) gehören. Die Kalomelelektrode bildet den negativen, die Platinelektrode den positiven Pol. Bei Benutzung des in dieser Zeitschr. **159**, 68, beschriebenen Potentiometers stellt man den rechten Skalendrehknopf auf 800, den linken auf 0, schaltet vorsichtig den Einschalter von *A* in Richtung *E*. Der Zeigerausschlag geht nach rechts. Nun gibt man aus einer Mikrobürette in kleinen Portionen Bromat in den Becher, schüttelt nach jedem Zufügen einmal um und überzeugt sich nach jeder Portion durch vorsichtiges Betätigen des Einschalters, daß der Zeiger noch nach rechts ausschlägt. Man kann auch den Einschalter auf einer Mittelstellung zwischen *A* und *E* belassen und solange in das Becherglas unter gelindem Umschütteln Bromatlösung eintropfen lassen, bis der Zeiger in die Nähe des Nullpunkts gekommen ist. Steht der Zeiger beim Einschalten nach *E* still, oder bewegt er sich zum ersten Male nach links, so schüttelt man das Becherglas gut um, wodurch er zumeist noch einmal nach rechts zurückkehrt. Die Titration ist beendet, wenn der Zeiger nach dreimaligem Schütteln von wenigen Sekunden Dauer im Verlauf von 1 Minute beim Einschalten stets noch deutlich nach links ausschlägt. Beim Umschütteln des Bechers läßt man die Platinelektrode in der Flüssigkeit; man hält das Becherglas in der rechten Hand und mit den Fingern derselben Hand stützt man die Elektrode.

Leerwert.

Stellt man die Platinelektrode in die Ferrisalzlösung, so wird das Potential gegenüber der gesättigten Kalomelelektrode gewöhnlich noch unter 800 Millivolt liegen, d. h., der Zeiger wird beim Einschalten noch nach rechts schlagen. Gibt man tropfenweise Bromatlösung hinzu, so wird nach wenigen Tropfen (zumeist nach zwei bis vier) der Endpunkt der Leertitration erreicht sein, der Zeiger also auch nach 1 Minute noch bei der Einschaltung von 800 Millivolt nach links abweichen.

Die bis zu diesem Punkte verbrauchte Bromatmenge ist nach Herstellung von neuen Lösungen jedesmal festzustellen. Untersucht man Lösungen, die außer Zucker noch sehr viele Salze enthalten, oder

will man den Zuckergehalt enteiweißter physiologischer Flüssigkeiten feststellen, so ist es unumgänglich nötig, sich durch eine kurze Titration von der Größe des Leerwertes zu überzeugen.

Zu diesem Zwecke gibt man zunächst die Eisensalzsäurelösung, dann die Reduktionsflüssigkeit und dann die Versuchslösung (in dieser Reihenfolge!) in einen Becher und titriert den Leerwert aus. Man achte darauf, daß man genau diejenigen Lösungsmengen auch zur Leertitration verwendet, die bei der Hauptbestimmung zur Anwendung kommen; man nehme also ebensoviel Eisensalzsäurelösung, die gleiche Menge der Reduktionslösung und *vor allem* auch dieselbe Menge des Blutfiltrats, des Leberfiltrats oder der sonstigen Zuckerlösung, wie bei der wirklichen Bestimmung.

Die aus physiologischen Flüssigkeiten stammenden Leerwerte sind zumeist besonders hoch und daher dringend zu berücksichtigen[1]).

Von den nach der Reduktion erhaltenen Bromatwerten sind dann die Zahlen, die bei der direkten Titration ohne vorhergehende Reduktion erhalten werden, also die Leerwerte, abzuziehen.

Wünschenswert ist es auch, sich von Zeit zu Zeit davon zu überzeugen, daß durch das Kochen der Reduktionslösung keine Erhöhung des Leerwertes erfolgt.

Man kann auch bei der Leerbestimmung immer so vorgehen, daß man die Reduktionslösung mit destilliertem Wasser zur vorgeschriebenen Gesamtsumme verdünnt, 3 Minuten im Sieden hält, abkühlt, die Eisensalzsäurelösung zusetzt und nunmehr erst mit Bromat titriert.

Da aber die Titration *ohne* vorhergehendes Sieden der Reduktionsflüssigkeit, die direkte Titration, meistens mit der eben beschriebenen völlig übereinstimmt, ist die erstere als einfachere und schnellere vorzuziehen.

Störungen.

Die auftretenden Störungen lassen sich als solche der *Reduktion* oder der *Titration* erkennen.

Die Störungen bei der Reduktion rühren von zu heftigem oder zu geringem Sieden her. Durch Auswahl der Asbestdrahtnetze, Regulierung der Bunsenbrenner und Erhitzen der Drahtnetze schon einige Zeit vor dem Aufstellen der Becher läßt sich stets ein ungefähr gleichzeitiger Siedebeginn und ein gleichmäßiges, ruhiges Sieden ermöglichen.

Störungen bei der *Titration* stammen wohl immer nur von der Platinelektrode her. Hat man mehrere der oben erwähnten Glasstab-

[1]) Harnsäure bindet proportional ihrer Menge Bromat. Eine Bestimmungsmethode für Harnsäure, die auf diesem Prinzip beruht und zu einer elektrometrischen Titration führt, wird zurzeit ausgearbeitet und soll als IV. Mitteilung dieser Serie erscheinen.

elektroden gebrauchsfertig vorrätig, so wechselt man gegebenenfalls nur die Elektrode aus. Starke Ammoniakdämpfe machen die Elektrode träge. Dasselbe wird durch Schwefelwasserstoff verursacht, doch lassen sich diese Gase ja stets vermeiden.

Die nicht im Gebrauch befindlichen Elektroden hält man in einer starken Bichromatschwefelsäurelösung. Die schlechten Elektroden erhitzt man einige Zeit in diesem Gemisch.

Herstellung der Lösungen.

1. Reduktionslösung.

72 g Natrium citricum von *Schering*[1]), chem. Fabrik a. Akt., Berlin, werden in ungefähr 140 ccm Aqua dest. unter Erhitzen gelöst, filtriert und abgekühlt. 5,4 g Natriumhydrat werden in etwa 25 ccm Aqua dest. gelöst, abgekühlt und zur Citratlösung hinzugegeben. 1,68 g Kupfersulfat „zur Analyse" werden in 25 ccm gelöst und zu der alkalischen Citratlösung hinzugefügt. Das ganze wird auf 200 ccm aufgefüllt.

2. Salzsäure-Eisenlösung.

Ferrisulfatlösung, 50 g Ferrisulfat, 200 g konzentrierte Schwefelsäure (1,84) werden auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt. Davon 25 ccm und 225 ccm konzentrierte Salzsäure (1,19) ergeben die Salzsäure-Eisenlösung.

3. n/50 K-Bromatlösung und n/100 K-Bromatlösung. 0,783 g $KBrO_3$ in 1 Liter gelöst = n/10 Bromatlösung; n/50 und n/100 durch Verdünnen der n/10. Titerstellung über Jodid und Thiosulfat.

Mikromethode.

Anwendungsgebiet: 0,24 bis 0,90 mg Glucose in 5 ccm Gesamtvolumen. Auf die Volumina ist *sorgsam zu achten!*

Zuckerlösung, eventuell aufzufüllen auf	5,0 ccm
Reduktionslösung	2,0 „
zusammen	7,0 ccm
Eisen-Salzsäurelösung	3,0 ccm
Molarität der Bromatlösung n/100.	
Titrationswert	*A* „
Leerwert	*L* „
Differenzwert =	*a* ccm

a ccm Bromat = $a \cdot 0{,}4 + 0{,}084$ mg Glucose (siehe Abb. 1).

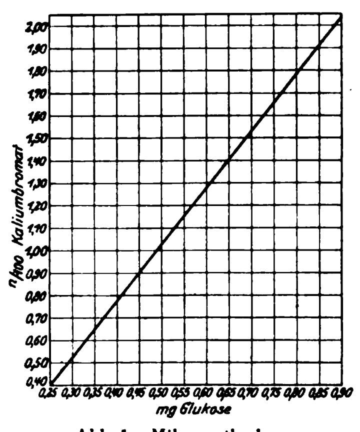


Abb. 1. Mikromethode.

[1]) Mit dem Salz von *Kahlbaum* erhielten wir häufig einen zu hohen Leerwert.

Halbmikromethode.

Anwendungsgebiet: 0,60 bis 2,40 mg Glucose in 10 ccm Gesamtvolumen. Auch hier sind die angegebenen Volumina genau einzuhalten!

Zuckerlösung, eventuell aufzufüllen auf . . .	10,0 ccm
Reduktionslösung	4,0 „
zusammen . . .	14,0 ccm
Eisensalzsäurelösung	5,0 ccm
Molarität der Bromatlösung n/50.	
Titrationswert	A „
Leerwert	L „
Differenzwert . . . . =	a ccm

a ccm Bromat = $a \cdot 0{,}74 + 0{,}2$ mg Glucose (siehe Abb. 2).

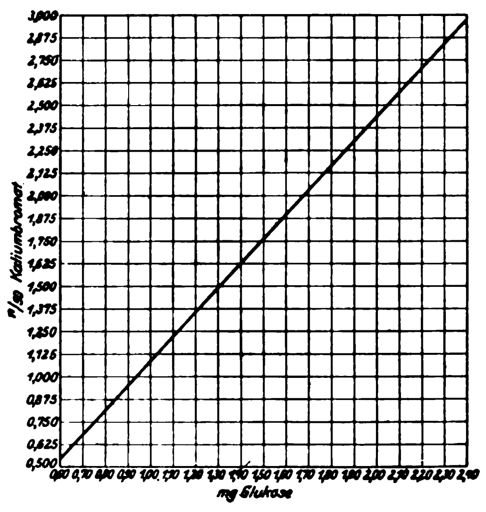


Abb. 2. Halbmikromethode.

Experimentelle Daten über die Mikromethode
(stets in ccm n/100 Bromatlösung).

I. Theoretischer Wert 0,39, Mittelwert aus 29 Bestimmungen 0,387.

Gefunden:

0,39	0,36	0,40	0,36	0,40	0,37
0,42	0,40	0,41	0,38	0,41	0,38
0,39	0,41	0,42	0,39	0,39	0,38
0,38	0,37	0,37	0,37	0,37	0,41
0,37	0,40	0,37	0,39	0,40	

II. Theoretischer Wert 0,54.

Gefunden:

0,51 0,51 0,53 0,53 0,53 0,53

III. Theoretischer Wert 0,69, Mittelwert aus 11 Bestimmungen 0,707.

Gefunden:

0,69 0,71 0,72 0,72 0,72 0,69
0,72 0,70 0,70 0,69 0,72

IV. Theoretischer Wert 0,85.

Gefunden:

0,84 0,83 0,86 0,84 0,86 0,84

V. Theoretischer Wert 0,99, Mittelwert aus 21 Bestimmungen 0,991.

Gefunden:

0,99 0,98 1,02 0,98 1,02 0,99
1,02 0,98 0,98 0,98 0,99 0,98
1,03 0,97 0,99 1,01 0,97 0,97
0,98 1,00 0,99

VI. Theoretischer Wert 1,59, Mittelwert aus 28 Bestimmungen 1,595.

Gefunden:

1,58 1,60 1,60 1,60 1,56 1,63
1,59 1,60 1,56 1,63 1,55 1,60
1,60 1,59 1,54 1,61 1,62 1,61
1,61 1,60 1,59 1,60 1,56
1,64 1,61 1,58 1,60 1,60

VII. Theoretischer Wert 1,89.

Gefunden:

1,88 1,86 1,88 1,83 1,88 1,85

Experimentelle Daten über die Halbmikromethode

(stets in ccm n/50 Bromatlösung).

I. Theoretischer Wert 0,702.

Gefunden:

0,70 0,71 0,68 0,69 0,69 0,69
0,68 0,71 0,69 0,72

II. Theoretischer Wert 0,864.

Gefunden:

0,88 0,86 0,88 0,89 0,87 0,86
0,89

III. Theoretischer Wert 1,026.

Gefunden:

0,99	1,00	1,05	1,03	1,01	1,04
0,99	1,03	1,01	1,01	1,03	1,03
1,03	1,03	1,02			

IV. Theoretischer Wert 1,512.

Gefunden:

1,52	1,52	1,50	1,51	1,51	1,49

V. Theoretischer Wert 1,836.

Gefunden:

1,84	1,84	1,84	1,84	1,81	1,77

VI. Theoretischer Wert 2,484.

Gefunden:

2,50	2,49	2,52	2,49	2,52	2,50

VII. Theoretischer Wert 2,646.

Gefunden:

2,66	2,64	2,64	2,66	2,64	2,66
2,66	2,65	2,63	2,66	2,64	2,66

VIII. Theoretischer Wert 2,97.

Gefunden:

3,00	2,93	2,98	2,95	2,95	2,95
2,99	2,97	2,94			

Fehlerrechnung.

a) Mikromethode.

Wir haben aus den für 0,48 mg und 0,72 mg Glucose erhaltenen Werten die Fehlerrechnung durchgeführt:

I. 0,48 mg.

$$\varepsilon = \pm \sqrt{\frac{S}{n-1}} \qquad S = \Delta_1^2 + \Delta_2^2 + \Delta_3^2 \cdots \Delta_n^2. \quad n = 21.$$

$\varepsilon = \pm$ 0,0072 mg = mittlerer Fehler der einzelnen Messung.

$w_1 = \pm$ 0,0048 mg = wahrscheinlicher Fehler der einzelnen Messung.

$$E = \pm \frac{\varepsilon}{\sqrt{n}}.$$

$E = \pm$ 0,0016 mg = mittlerer Fehler des Mittelwertes.

$w_2 = \pm$ 0,001 mg = wahrscheinlicher Fehler des Mittelwertes.

II. 0,72 mg. $n = 23$.

$\varepsilon = \pm\ 0{,}0096$ mg = mittlerer Fehler der einzelnen Messung.

$w_1 = \pm\ 0{,}0065$ mg = wahrscheinlicher Fehler der einzelnen Messung.

$E = \pm\ 0{,}0018$ mg = mittlerer Fehler des Mittelwertes.

$w_2 = \pm\ 0{,}0012$ mg = wahrscheinlicher Fehler des Mittelwertes.

Über die Streuung unterrichtet die Abb. 3.

Von 65 wahllosen Bestimmungen liegen 30 innerhalb von $\pm$ 1 Proz. Abweichung, 60 innerhalb von + 3,1 und — 2,1 Proz. Abweichung.

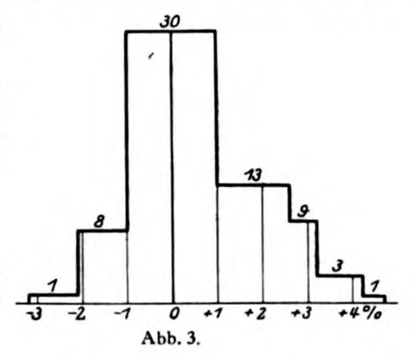


Abb. 3.

b) Halbmikromethode.

Hier haben wir die Fehlerrechnung für 0,96 und 2,16 mg Glucose durchgeführt.

I. 0,96 mg.

$$\varepsilon = \pm \sqrt{\frac{S}{n-1}} \qquad S = \Delta_1^2 + \Delta_2^2 + \Delta_3^2 + \cdots \Delta_n^2.$$

$$n = 22.$$

$$E = \pm \frac{\varepsilon}{\sqrt{n}}.$$

$E = \pm\ 0{,}01396$ mg = mittlerer Fehler der einzelnen Messung.

$w_1 = \pm\ 0{,}093$ mg = wahrscheinlicher Fehler der einzelnen Messung.

$E = \pm\ 0{,}0036$ mg = mittlerer Fehler des Mittelwertes.

$w_2 = \pm\ 0{,}0024$ mg = wahrscheinlicher Fehler des Mittelwertes.

II. 2,16 mg. $n = 24$.

$E = \pm\ 0{,}0195$ mg = mittlerer Fehler der einzelnen Messung.

$w_1 = \pm\ 0{,}013$ mg = wahrscheinlicher Fehler der einzelnen Messung.

$E = \pm\ 0{,}00473$ mg = mittlerer Fehler des Mittelwertes.

$w_2 = \pm\ 0{,}00315$ mg = wahrscheinlicher Fehler des Mittelwertes.

Über die Streuung bei der Halbmikromethode unterrichtet Abb. 4.

Von 24 wahllosen Bestimmungen liegen 19 innerhalb $\pm$ 1,0 und — 1,2 Proz. Abweichung, davon 14 innerhalb $\pm$ 0,6 Proz. Abweichung.

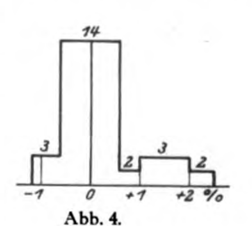


Abb. 4.

Die Bestimmung des Zuckers im Blute.

Zur Enteiweißung benutzten wir die von *L. Michaelis* (l. c.) angewandte kombinierte Enteiweißungsmethode. Bei ihr wird der größte Teil des Eiweißes durch Erhitzen koaguliert und der Rest mit kolloidalem Eisen entfernt.

Wir arbeiteten nach folgender Vorschrift: 1,6 ccm Blut werden mit 7,5 ccm destilliertem Wasser in einem Becherglas einmal kurz aufgekocht. Nach dem Kochen werden drei Tropfen n Essigsäure, dann unter Umschütteln tropfenweise 9 ccm einer 1 : 9 verdünnten Lösung des 5proz. kolloidalen Eisenhydroxyds hinzugefügt. Dann kommen fünf Tropfen n NaOH und drei Tropfen einer gesättigten Na_2SO_4-Lösung hinzu. Der Inhalt des Becherglases wird nach Umschütteln nunmehr in einen Meßzylinder von 20 ccm gegossen. Das Becherglas mit 2 × ½ ccm Aqua dest. nachgespült und mit Aqua dest. auf 20 aufgefüllt. Das ganze wird dann durch ein trockenes Filter filtriert, zweimal je 5 ccm des Filtrats zur Reduktion benutzt und weitere 5 ccm zur direkten Titration des Leerwertes.

Vergleichende Untersuchungen mit der Methode nach *Bertrand-L. Michaelis* ergaben folgende Resultate:

	Bertrand-Michaelis Proz.	Elektrometrisch Proz.
Blut I	0,111	0,108
Blut II	0,109	0,107
Blut III	0,0715	0,072
Blut IV	0,081	0,079
Blut V	0,125	0,122

Bei den ersten Untersuchungen half Herr Dr. *Edgar Warburg*, Berlin, wofür ihm auch an dieser Stelle bestens gedankt sei. Später leistete mir Fräulein *Hanna Reuker*, Berlin-Karlshorst, wertvolle Hilfe.

Über Hemmung der Tumorglykolyse durch Anilinfarbstoffe.

Von

Muneo Yabusoe.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 30. November 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Ich habe auf Vorschlag der Herren *W. Schoeller* und *O. Warburg* untersucht, in welcher Weise Anilinfarbstoffe die glykolytische Wirkung von Tumorgewebe beeinflussen.

Als Versuchsmaterial benutzte ich das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom, für jeden Versuch vier dünne Carcinomschnitte von 1 bis 2 mg Trockengewicht. Je ein Schnitt wurde in 30 ccm Ringerlösung[1]) gebracht, die den zu prüfenden Farbstoff in den Konzentrationen 0 und 10^{-5}, 10^{-4} und 10^{-3} Molen pro Liter enthielt, und bei 38° unter Luftabschluß 1 Stunde lang in der Lösung bewegt. Nach dieser Zeit war der Schnitt mit der Farbstoffkonzentration der Lösung im Gleichgewicht und die Gleichgewichtskonzentration des Farbstoffs — wegen der kleinen Gewebemenge — nahezu gleich der Anfangskonzentration des Farbstoffs.

St

Abb. 1.

Während der geschilderten Behandlung der Schnitte wurden vier Gefäße von der Form der Abb. 1 vorbereitet, in die je 3 ccm Ringerlösung mit den Farbstoffkonzentrationen 0 und 10^{-5}, 10^{-4} und 10^{-3} eingefüllt wurden. In jede Lösung wurde dann derjenige Schnitt gegeben, der mit ihr im Gleichgewicht war.

Die Messung der Glykolyse geschah bei 38° und in 5 Vol.-Proz. Kohlensäure in Stickstoff, wie früher beschrieben[2]), wobei die Versuchs-

[1]) Die Ringerlösung war dem Rattenserum isoton und enthielt pro Liter $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mole Bicarbonat und 2 g Glucose.

[2]) Diese Zeitschr. 152, 51, 1924.

zeit 60 Minuten betrug. War in dieser Zeit der Kohlensäuredruck um h_{CO_2} mm gestiegen, so war die gebildete Milchsäure in Kubikmillimetern

$$x_M = h_{CO_2} \cdot k_{CO_2}, \tag{1}$$

wo k_{CO_2} die Gefäßkonstante für Kohlensäure bedeutet.

Waren die Messungen beendigt, so wurden die Schnitte aus den Gefäßen herausgenommen, bei 100^0 bis zur Konstanz getrocknet und gewogen. Durch besondere Versuche habe ich mich überzeugt, daß die aufgenommene Farbstoffmenge immer klein war gegen das Gewebegewicht, so daß die Glykolyse Q_M ohne merklichen Fehler durch Division von x_M durch das gefundene Gewicht berechnet werden konnte.

Die Wirkung der Farbstoffe auf die Glykolyse wurde ausgedrückt durch die Quotienten

$$\frac{[Q_M]_0 - [Q_M]_c}{[Q_M]_0} \cdot 100, \tag{2}$$

wo $[Q_M]_0$ die Glykolyse bei der Farbstoffkonzentration Null und $[Q_M]_c$ die Glykolyse bei der Farbstoffkonzentration c bedeutet. In keinem Falle war $[Q_M]_c$ größer als $[Q_M]_0$, sondern immer nur gleich oder kleiner als $[Q_M]_0$. Es zeigte sich also nie eine Beschleunigung der Glykolyse, sondern immer nur — falls eine Wirkung vorhanden war — eine Hemmung. Deshalb bedeutet der Ausdruck (2) die prozentische Hemmung der Glykolyse durch die Farbstoffkonzentration c.

In den Tabellen I bis V habe ich die prozentischen Hemmungen der Glykolyse für eine Farbstoffkonzentration von 10^{-4} Mol./Liter (in Ringerlösung) zusammengestellt. Die wirksamsten Farbstoffe finden wir unter den Triphenylmethan- und Chinolinfarbstoffen. Erstere sind nur dann stark wirksam, wenn sie keine Säuregruppe enthalten. Beispielsweise wird die Wirkung des Fuchsins (vgl. Tabelle I) sehr viel kleiner, wenn der Farbstoff sulfuriert wird. Auch beim Übergang von der tertiären zur quaternären Base (vgl. Kristallviolett und dessen Chlormethylat, Tabelle I) beobachtet man ein starkes Absinken der Wirkung.

Fügt man die gleichen Farbstoffe zu Blutserum, statt zu Ringerlösung, und mißt die Hemmung der Glykolyse durch das farbstoffhaltige Serum, so findet man, daß die Wirkungsstärken in Serum etwa zehnmal kleiner sind als in Ringerlösung. Die Farbstoffe, sowohl saure, wie basische, verbinden sich mit den Eiweißkörpern des Serums, wodurch die Konzentrationen der Farbstoffe in der wässerigen Serumphase vermindert werden. Um mit einem Farbstoff in Serum die gleiche Hemmung der Glykolyse hervorzubringen wie in Ringerlösung, muß man in Serum rund zehnmal mehr Farbstoff auflösen als in Ringerlösung.

Tabelle I.

Triphenylmethanfarbstoffe.

Farbstoff		Eine 10^{-4} mol. Lösung hemmt d. Glykolyse um Proz.
Parafuchsin		34
Fuchsin (Methyl-Parafuchsin)		34
Fuchsin S (Fuchsin-Sulfosäure)		0
Tryparosan (Monochlorfuchsin)		55
Methylviolett		42
Äthylviolett		65
Kristallviolett		69
Methylgrün (Chlormethylat des Kristallvioletts)		0
Malachitgrün		70
Neusolidgrün 3 B (ortho-Chlor-Malachitgrün)		74
Setocyanin		29
Firnblau		65
Nachtgrün	Sulfosäuren	17
Säuregrün	Sulfosäuren	15
Erioglaucin	Sulfosäuren	15
Patentblau Höchst	Sulfosäuren	0
Isaminblau 6 B	Sulfosäuren	6
Chromgrün (Carbonsäure)		34
Brillantwollblau extra H	Sulfosäuren des Diphenyl-Naphthyl-Methans	9
Echtsäureblau	Sulfosäuren des Diphenyl-Naphthyl-Methans	0
Naphthalinblau Höchst	Sulfosäuren des Diphenyl-Naphthyl-Methans	0
Wollgrün HS	Sulfosäuren des Diphenyl-Naphthyl-Methans	0

Tabelle II.

Chinolinfarbstoffe.

Farbstoff	Eine 10^{-4} mol. Lösung hemmt d. Glykolyse um Proz.	Farbstoff	Eine 10^{-4} mol. Lösung hemmt d. Glykolyse um Proz.
Chinolinrot	50	Pinacyanol Höchst	19
Cyanin	64	Homocol Bayer	17
Orthochrom Höchst	55	Isocol "	35
Pinaverdol "	39	Chinolingelb	0
Pinachrom "	64		

Tabelle III.

Acridinfarbstoffe.

Farbstoff	Eine 10^{-4} mol. Lösung hemmt d. Glykolyse um Proz.	Farbstoff	Eine 10^{-4} mol. Lösung hemmt d. Glykolyse um Proz.
Rivanol	0	Benzoflavin	18
Trypaflavin	26	Phosphin	23
Acridingelb	12	Homphosphin	14
Acridinorange	17		

Tabelle IV.

Azofarbstoffe.

Farbstoff	Eine 10^{-4} mol. Lösung hemmt d. Glykolyse um Proz.	Farbstoff	Eine 10^{-4} mol. Lösung hemmt d. Glykolyse um Proz.
Chrysoidin	11	Heliotrop	11
Kongorot	0	Benzoazurin	11
Dianilblau	7	Brillantschwarz	4
Chrysophenin G	0	Trypanrot	6
Azoblau	0	Trypanblau	24

Tabelle V.

Verschiedene Farbstoffklassen.

Farbstoff		Eine 10^{-4} mol. Lösung hemmt d. Glykolyse um Proz.
Safranin extra	Safranine	8
Magdalarot	Safranine	11
Indulin	Safranine	0
Methylenviolett	Safranine	24
Nilblau 2 B	Oxazine	0
Meldolablau	Oxazine	20
Methylenblau	Thiazine	5
Neumethylenblau N	Thiazine	5
Eosin B	Phtaleine	0
Erythrosin	Phtaleine	7
Tartrazin		0
Alizarinsulfosäure		0

Zur Frage der experimentellen Calcämie.

Von

P. Astanin.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie an der militär-medizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 30. November 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In letzter Zeit wird dem Schicksal der Calciumsalze im Organismus viel Aufmerksamkeit zugewandt, besonders ihrer Speicherung und Ablagerung in den Geweben. Vieles ist hier jedoch noch ungeklärt. Sogar eine genügend einfache und zugleich genaue Methode der Calciumbestimmung im Blute und in den Geweben ist erst kürzlich ausgearbeitet worden. Hierher gehört in erster Linie die mikrochemische Methode von *de Waard*[1]), welche von einer Reihe von Verfassern als die vollkommenste und zweckmäßigste bei der periodischen Bestimmung der Calciumschwankungen, z. B. im Blute, bezeichnet wird. Mit Hilfe dieser Methode habe ich bei Kaninchen *die Schwankungen des Calciumgehalts im Blute nach parenteraler und peroraler Einführung verschiedener Ca-Verbindungen untersucht.* Es war der Zweck dieser Untersuchungen, zunächst den unmittelbaren Verbleib der eingeführten Ca-Salze zu verfolgen und festzustellen, bis zu welchem Grade auf diesem Wege ein erhöhter Ca-Gehalt des Blutes, also eine experimentelle Calcämie zu erzielen ist. In dieser letzteren Frage gehen die Meinungen der einzelnen Forscher weit auseinander. Sogar in bezug auf die Aufsaugung des Ca aus dem Darmkanal besteht noch keine einheitliche Auffassung. *Denis* und *Minet*[2]), *Handowsky*[3]), *Jakobowitz*[4]) sprechen sich gegen, *Laws* und *Cowie*[5]) u. a. für eine Aufsaugung aus.

---

[1]) Diese Zeitschr. **97**, 176, 1919.

[2]) Journ. of biol. Chem. **41**, 1920; siehe Ber. üb. d. ges. Physiol. **2**, 113.

[3]) Jahrb. f. Kinderheilk. **48**, H. 6, 1921.

[4]) Ebendaselbst **42**, 256, 1920.

[5]) Amer. Journ. of dis. of child. **13**, 1917; zitiert nach *Herzfeld* und *Lubowski*, Deutsch. med. Wochenschr. **49**, 603, 1923.

Bevor ich zu meinen Ergebnissen übergehe, sei noch kurz die Untersuchungsmethode erwähnt. Das chemische Prinzip der *de Waard*schen Methode besteht, wie bekannt, in folgendem: Die Fällung des Ca in Form von oxalsaurem Ca unmittelbar aus dem Plasma, sorgfältiges Abwaschen des Sediments, Überführung desselben in schwefelsaures Ca, Titrieren der frei gewordenen Oxalsäure mit 0,01 proz. Chamäleonlösung. Die Menge der Oxalsäure zeigt uns die Ca-Menge an, welche also indirekt bestimmt wird. Genau genommen, ist dies Prinzip nicht neu; schon 1893 haben *Pribram* und *Gerlach* darauf hingewiesen, daß Calcium, Magnesium, Phosphor- und Schwefelsäure im Plasma ebenso wie in wässerigen Lösungen gefällt werden können. *de Waard* gebührt das Verdienst, die Mikromethode der Ca-Bestimmung im Blute sorgfältig ausgearbeitet zu haben, so daß sich in der letzten Zeit die meisten Autoren dieser *de Waard*schen Methode bedienen. Allerdings sind die Resultate beim Manipulieren mit so geringen Dosen nur relativ, worauf auch der Autor selbst hinweist.

Zwecks Kontrolle der Methode wurde von mir der Ca-Gehalt ein und desselben Plasmas unter verschiedenen Untersuchungsbedingungen bestimmt. Als Beispiel sei hier eine derartige Analyse angeführt (Tabelle I).

Tabelle I.

Versuchs-nummer	Typus der Analyse	Analysierte Plasmamenge ccm	Ca mg-Proz.
1	Veraschung	5	15,0
2	„	1	15,0
3	Direkte Fällung	2	15,0
4	„ „	1	15,0
5	„ „	0,5	15,0

Aus der angeführten Tabelle I geht hervor, daß die *de Waard*sche Methode genügend genaue und beständige Resultate gibt.

Meine Versuche bezweckten die Klärung der Frage, wie sich der Ca-Gehalt des Blutes ändert:

1. bei Einführung verschiedener Ca-Salze direkt in die Blutbahn,
2. bei Einführung von Ca-Salzen in den Magen,
3. bei chronischer Fütterung mit Ca-Salzen,
4. bei Ausschaltung der exkretorischen Organe und gleichzeitiger Einführung von Ca-Salzen ins Blut.

Außerdem wurde zur Kontrolle der Ca-Gehalt des Blutes bestimmt:

5. bei der Blutentziehung ohne Ca-Einführung und
6. in der Norm.

Die Resultate der ersten Versuchsgruppe mit der Einführung von Ca-Salzen ins Blut (in die Ohrvene) sind auf der Abb. 1 angeführt.

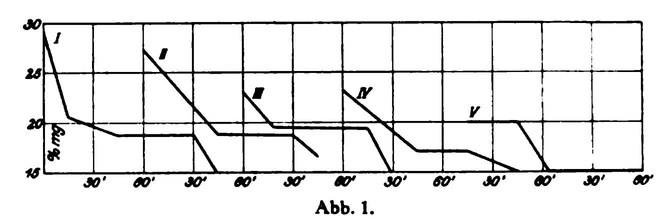


Abb. 1.

1. Versuch. Kaninchen von 2,1 kg Gewicht. Einführung von Calc. glycerophosphor. intravenös (95 mg Ca). Ausfuhr 1 Stunde 45 Minuten.

2. Versuch. Gewicht 2,8 kg Calc. glycerophosphor. (95 mg Ca). Ausfuhr 1 Stunde 45 Minuten.

3. Versuch. Gewicht 1,8 kg. Calc. phosphor. colloidale (48 mg Ca). Ausfuhr 1 Stunde 15 Minuten.

4. Versuch. Gewicht 1,8 kg. Calc. phosphor. colloidale (48 mg Ca). Ausfuhr 1 Stunde 30 Minuten.

5. Versuch. Gewicht 2,3 kg. Calc. stearinicum coll. (48 mg Ca). Ausfuhr 45 Minuten.

Die Blutproben wurden jede ¼ Stunde nach Ca-Einführung entnommen.

Aus der Abb. 1 ist ersichtlich, daß:

1. in der ersten Zeit die größte Menge der eingeführten Ca-Salze ausgesondert wird und die Schnelligkeit der Aussonderung besonders groß ist;
2. die durchschnittliche Dauer der Aussonderung etwa 1 Stunde 15 Minuten bis 1 Stunde 30 Minuten beträgt; sogar bei einer Einführung von verschiedenen Verbindungen (Calc. glycerophosphoricum und Calc. phosphoricum) werden dieselben ungefähr gleich schnell aus dem Blute ausgeschieden. Diese Beobachtung stimmt mit derjenigen von *Sieburg* und *Kessler*[1]) überein.

W. Heubner und *P. Rona*[2]) nehmen an, daß nach erfolgter intravenöser Einführung von Ca-Salzen die Norm etwa nach 2 Stunden wieder hergestellt ist.

Die Kurven der Ca-Aussonderung aus dem Blute können in meinen Versuchen in drei charakteristische Abschnitte eingeteilt werden:

1. steiles Abfallen (bis etwa 20 mg-Proz.),
2. ein gewisses Verweilen auf 18 bis 20 mg-Proz.,
3. Abfallen bis zur Norm.

---

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **96**, 1923.

[2]) Diese Zeitschr. **92**, 1919.

Das Wesen des zweiten Abschnittes kann vielleicht durch das dynamische Gleichgewicht erklärt werden, welches sich in bezug auf das Ca in den Geweben einstellt.

Interessant ist es, daß *Sieburg* und *Kessler*[1]), welche die Aussonderung verschiedener Ca-Salze aus dem Blute untersuchten, zu dem Schluß gelangten, daß diese Salze etwa nach ½ Stunde aus dem Blute verschwinden. Es ist anzunehmen, daß die von diesen Autoren angewandte biologische Methode der Ca-Bestimmung nur die erste Periode der schnellen Ca-Aussonderung aus dem Blute anzeigte. Die zweite Periode des konstanteren Ca-Gehalts entging ihnen.

Die oben angeführten Kurven der Ca-Aussonderung aus dem Blute sind ihrem allgemeinen Charakter nach denjenigen vollständig analog, welche *Okuneff*[2]) für die Abwanderung des Farbstoffs Trypanblau aus dem Blute festgestellt hat.

Die Resultate der nächsten Versuchsgruppe mit der Ca-Einführung in den Magen sind auf der Abb. 2 dargestellt. Folgendes ist hier be-

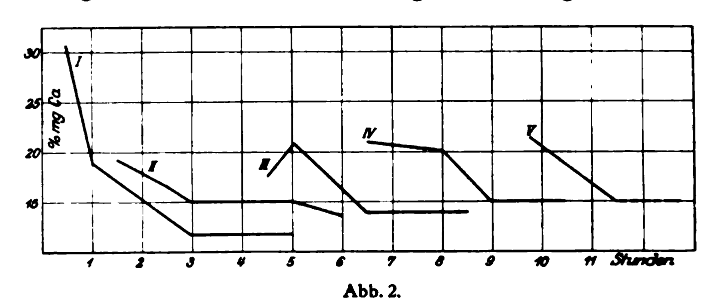


Abb. 2.

Versuche mit der Einführung von Ca-Salzen in den Magen. Die erste Blutprobe wurde ½ Stunde nach der Ca-Einführung entnommen, die weiteren Proben je 1 Stunde danach.

achtenswert: Die Aufsaugung der Ca-Salze aus dem Magendarmkanal erfolgt schon in der ersten halben Stunde nach der Einführung, und der Ca-Gehalt im Blute steigt in dieser Zeit etwa bis zu 20 mg-Proz. und höher, wie z. B. im Versuch 1.

Versuch 1.	Gewicht des Kaninchens	2,1 kg	Eingeführt wurde Calc. glycerophosphor. (950 mg Ca) (10 proz. Lösung)
„ *2.*	„ „ „	2,1 „	
„ *3.*	„ „ „	1,7 „	
„ *4.*	„ „ „	1,5 „	Calc. chloric. (370 mg Ca) (10 proz. Lösung)
„ *5.*	„ „ „	2,1 „	

Weiterhin wird in diesen Versuchen die Norm recht bald wieder hergestellt, jedoch wesentlich langsamer als in den vorhergehenden. Dieser Umstand läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß gleichzeitig

[1]) l. c.

[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **201**, 579, 1923.

mit der Aussonderung aus dem Blute auch noch die Aufsaugung aus dem Darm stattfindet.

Somit führte in diesen Versuchen die Aufsaugung der Ca-Salze aus dem Darm zur *Hypercalcämie*, welche jedoch bei den von uns eingeführten Dosen nicht lange anhält (2 bis 4 Stunden). Die wiederholte Einführung von $CaCl_2$ führt nicht zur Hypercalcämie, was aus der nächsten Versuchsgruppe auf der Tabelle II hervorgeht.

Tabelle II.

Wiederholte Ca-Einführungen in den Magen. (Die Blutentnahmen erfolgten 24 Stunden nach jeder Ca-Einführung.)

Nr.	Gewicht der Kaninchen g	Ca in mg-Proz. Tage 1	2	3	4	5	Tägliche Einführung von 3 Proz. $CaCl_2$ ccm
1	1990	15,0	15,0	14,8	15,0	15,0	60,0
2	1967	15,0	15,0	14,8	15,0	15,0	60,0
3	2435	15,0	15,0	14,8	15,0	22,8*)	100,0
4	2685	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	100,0

*) Das Kaninchen ging bald darauf an Sepsis zugrunde.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, *steigt der Ca-Gehalt im Blute bei fünftägiger Ca-Fütterung der Kaninchen nicht an.* In bezug auf die Resorption der Ca-Verbindungen aus dem Darm gehen die Meinungen weit auseinander. *Herzfeld* und *Lubowski* (l. c.) erwähnten die Arbeiten von *Denis* und *Minet*, *Handowsky*, *Jakobowitz*, welche der Ansicht sind, daß weder die Art der Ernährung, noch auch die Verfütterung von Ca selbst den Ca-Gehalt im Blute ändert; das genaue Gegenteil behaupten *Laws* und *Cawie*. *N. Voorhoewe*[1]) beobachtete bei einem erwachsenen Manne nach täglicher Einführung von 15,0 Calcium lactic. im Laufe 1 Woche nur eine geringe Zunahme des Ca im Blute.

A. Koch fütterte drei junge Kaninchen im Laufe 1 Woche mit Ca-Salzen und fand gleichfalls eine geringe Steigerung.

In meinen Versuchen gelang es mir, wie gesagt, bei wiederholten Einführungen von Ca in den Magen bei Kaninchen eine Erhöhung des Ca-Gehalts im Blute nicht zu erzielen. Augenscheinlich rief jede einzelne Einführung, ebenso wie in der zweiten Versuchsgruppe, eine verhältnismäßig schnell vorübergehende Hypercalcämie hervor, wobei die Fähigkeit des Organismus zur Ca-Aussonderung aus dem Blute hierdurch nicht beeinträchtigt wird.

In der nächsten Versuchsgruppe wurden die Ca-Verbindungen intravenös Kaninchen eingeführt, welchen unmittelbar vorher die

[1]) Diese Zeitschr. 32, 1911.

Nieren und der Dickdarm entfernt worden war, oder aber gleichzeitig mit der Nierenentfernung möglichst alle Mesenterialgefäße unterbunden wurden, welche zum Dickdarm führten. In zwei Versuchen fand anfänglich eine ebenso rapide Aussonderung des Ca aus dem Blute statt wie bei normalen Tieren. *Augenscheinlich wird das Ca in diesem Zeitabschnitt vorzugsweise in die Gewebe*, nicht aber durch die Exkretionsorgane *ausgeschieden*. Bei einem Kaninchen jedoch, welches eine verhältnismäßig geringe Menge (49 mg) Ca ins Blut eingeführt bekam, verzögerte sich die Aussonderung des Ca aus dem Blute, vielleicht wegen des in diesem Falle nur geringen Unterschieds der Ca-Konzentration in den Geweben und im Blute.

Was nun endlich die *Kontrollversuche* betrifft, so fanden wir keinerlei Anhaltspunkte für eine Änderung des Ca-Gehalts im Blute nach wiederholten Blutentziehungen. Wenn diese letzteren eine Änderung des Ca-Gehalts bewirken, wie *Heubner* und *Rona* (l. c.) angeben, so ist dieses augenscheinlich bei unseren Versuchsbedingungen (Entnahme geringer Blutmengen) nicht festzustellen.

Die experimentellen Ergebnisse bezüglich der Aussonderung des überschüssigen Ca aus der Blutbahn gestatten uns, eine gewisse Gesetzmäßigkeit des Prozesses festzustellen. Wenn wir, dem Beispiel *E. Freys*[1]) folgend, diesen Prozeß vom Standpunkt der Diffusion aus betrachten, so läßt er sich auch mathematisch darstellen. *E. Frey* gibt für die Diffusion im Tierkörper und ihre Abhängigkeit von den verschiedensten Bedingungen eine komplizierte mathematische Formel (je nach dem eingeführten Stoffe, der Menge des Lösungsmittels, der Zeit, der Konzentrationsdifferenz der Ca-Salze in den Geweben und dem Blute, der Oberflächenspannung, der Arbeit der Exkretionsorgane).

In der vorliegenden Arbeit ist es mir wegen der fehlenden experimentellen Daten nicht möglich, eine umfassende mathematische Bewertung der untersuchten Erscheinungen zu geben, und dieses war auch nicht der Zweck meiner Untersuchungen. Es erscheint hier wünschenswert, die den Prozeß bestimmenden Bedingungen in einfacherer Form auszudrücken und die mathematische Formel für die Gesetzmäßigkeit der Ca-Ausscheidung aus dem Blute zu finden; dieses wäre eine schöne Bestätigung der experimentellen Ergebnisse.

Wenn wir annehmen dürfen, daß es sich im gegebenen Falle um einen Diffusionsprozeß handelt, also um einen Prozeß, welcher unter dem Gesetz der Massenwirkung steht, so läßt sich derselbe durch die Monomolekularreaktion

$$\frac{dx}{dt} = K(\alpha - x),$$

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges Phys. 177, 1919.

ausdrücken, wo a = die Anfangsmenge (der Überschuß + die Norm), x = die ausgeschiedene Menge (in der abgelaufenen Zeitspanne), $a - x$ = die übriggebliebene Menge.

Die Schnelligkeit der Aussonderung bezeichnen wir durch das Verhältnis der unendlich geringen Menge des ausgeschiedenen Stoffes (dx) zur unendlich kurzen Zeitspanne (dt). Dieses Verhältnis ist der zurückgebliebenen Menge ($a - x$) proportional.

So haben wir denn $\frac{dx}{dt} = K\,(a - x)$; K = der Proportionalkoeffizient.

Hieraus folgt $\frac{dx}{a - x} = K dt$; integrieren wir dieses, so haben wir $- l_n\,(a - x) = KT + \text{const.}$

Bei $t = 0$ und $x = 0$ erhalten wir $- l_n\ a = \text{const}$; fügen wir dieses in die oben angeführte Gleichung ein, so erhalten wir $- l_n(a - x) = kt - l_n\,a$; hieraus folgt

$$l_n\,a - l_n\,(a - x) = kt,$$

$$l_n \frac{a}{a - x} = kt,$$

$$k = \frac{1}{t}\, l_n \frac{a}{a - x}\,.$$

Stellen wir nun in diese Gleichung die experimentell festgestellten Zahlen ein, so haben wir folgendes Bild vor uns (Tabelle III).

Tabelle III.

Versuche mit Ca-Einführung ins Blut.

Nr. der Versuche	t	a	$a-x$	$K = \frac{1}{t}\, l_n \frac{a}{a-x}$
1	105	29,4	14,0	0,007
2	105	27,5	17,5	0,005
3	90	23,0	15,0	0,005
4	75	23,0	15,0	0,006
5	60	19,0	15,0	0,005
			Durchschnitt:	0,006

Aus dem Vorstehenden ersehen wir, daß K eine mehr oder weniger ständige Größe darstellt, was auf die Gleichartigkeit des Prozesses hinweist. Die Größenschwankungen von K lassen sich erklären 1. dadurch, daß die angeführte Differentialgleichung durchaus nicht die Gesamtheit des Diffusionsprozesses im Organismus umfaßt — worauf auch schon oben hingewiesen wurde — und 2. durch die möglichen experimentellen Ungenauigkeiten. Jedenfalls ist K, wie ersichtlich, fast konstant, was bis zu einem gewissen Grade eine Kontrolle der Versuche darstellt.

Schlußfolgerungen.

1. Die Art der Aussonderung des Ca aus dem Blute erinnert an die von *Okuneff* untersuchte Aussonderung einiger vitaler Farbstoffe und die von *Frey* untersuchte der Nitrate und Jodide.

2. Eine chronische Calcämie läßt sich unter normalen Verhältnissen durch Verfütterung von Ca-Verbindungen nicht hervorrufen. Die Ca-Salze treten jedoch aus dem Darmkanal ins Blut über und rufen nach der Einführung in den Magen eine vorübergehende Hypercalcämie hervor; die durchschnittliche Dauer derselben beträgt 2 bis 4 Stunden. Dieser Erfolg läßt sich mit verschiedenen Ca-Verbindungen erzielen.

3. Die Ausschaltung der Exkretionsorgane beeinflußt nur in einem verhältnismäßig geringen Grade die Aussonderung des Ca aus dem Blute.

4. Geringere Blutentziehungen üben keinen merklichen Einfluß auf den Ca-Gehalt des Blutes aus.

5. Die *de Waard*sche Methode der Ca-Bestimmung im Blute gibt recht genaue und miteinander vergleichbare Resultate.

6. Die zwecks Beurteilung der Versuche angewandte mathematische Formel der monomolekularen Reaktion $\frac{dx}{dt} = k(a - x)$ ergab für die großen K eine Reihe annähernd gleicher Ziffern.

Chemische Untersuchungen über den Prozeß der dystrophischen Nierenverkalkung beim Kaninchen.

Von

I. Remesow.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie an der Militär-Medizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 30. November 1925.)

Die Tatsache, daß bei Kaninchen nach dauernder oder vorübergehender Unterbindung der Nierengefäße Calcination der Nieren, selbst Knochenbildung stattfindet, ist von mehreren Forschern schon seit längerer Zeit festgestellt [*Blessig*[1]), *Litten*[2]), *von Werra*[3]), *von Kóssa*[4]), *Maximow*[5]), *Sacerdotti-Frattin*[6]), *Poscharissky*[7])]. Indessen trugen die Arbeiten dieser Autoren einen rein morphologischen Charakter, und nur von dieser Seite kann die Frage als erforscht betrachtet werden.

Bei vorübergehender, ein- bis zweistündiger Unterbindung der Nierengefäße fanden genannte Forscher nach Lösung der Ligatur stark ausgeprägte nekrotische Veränderungen des Nierenepithels. In der Niere fanden sich auch Kalkkörner, darauf aber konnte der Prozeß der Decalcination und der völligen Restitution des ganzen Organs beobachtet werden. *von Werra*, die Angaben *Littens* bestätigend, behauptet indessen, daß nach einstündiger Unterbindung der Nierengefäße es sich nicht um völlige Nekrose des Harnkanälchenepithels handelt, sondern daß nur eine Schwächung seiner physiologischen Tätigkeit stattfindet, welche eine vorübergehende Kalkablagerung zur Folge hat. Bei dauernder Ligatur der Nierengefäße findet ebenfalls Verkalkung der Nieren statt (*von Werra, von Kóssa, Sacerdotti-Frattin*).

Schon am zweiten Tage nach der Unterbindung wurde im Lumen der Harnkanälchen Kalk in Form von körnigen Zylindern vorgefunden; vom 20. Tage an findet, nach Beobachtung genannter Verfasser, Kalkablagerung

---

1) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **16**, 1859.
2) Ebendaselbst **83**, 1881; 88, 1882.
3) Ebendaselbst 88, 1882.
4) Beitr. z. pathol. Anat. u. allg. Pathol. **29**, 1901.
5) Ebendaselbst **41**, 1907.
6) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **168**, 1902.
7) Beitr. z. pathol. Anat. u. allg. Pathol. **38**, 1902.

in größeren Mengen statt, welche insbesondere zwei Zonen betrifft: die Oberfläche gleich unter der Kapsel und eine tiefere Zone, die sich bis zur Basis der Pyramiden erstreckt. Es ist jedoch zu bemerken, daß *Talma*[1]) einen Fall beschrieben hat, in dem die Niere 8 Wochen nach der Unterbindung um die Hälfte ihres Gewichts gesunken, morphologisch nicht die geringsten Spuren einer Verkalkung zeigte.

In Nieren, welche 2 bis 3 Monate nach der Unterbindung untersucht wurden, ist neben ausgeprägter Petrifikation der Rinde, heteroplastische Knochenbildung mit Elementen von Knochenmark nachgewiesen. Dieser befand sich hauptsächlich unter dem Epithel der Papillen.

Wie gesagt, die Frage von der dystrophischen Verkalkung der Nieren bei Unterbindung der Nierengefäße ist bisher nur morphologisch behandelt worden; es war daher angebracht, diesen Prozeß nun auch chemisch zu untersuchen.

Von allen mir bekannten Verfassern hat nur *von Kóssa* (l. c.) es versucht, die Frage von dieser Seite zu fassen, indem er den Kalkgehalt in den Nieren gesunder Kaninchen und solcher, deren Nierengefäße unterbunden waren, bestimmte. Jedoch sind seine Angaben spärlich und nicht systematisiert (es sind von ihm die Nieren von bloß fünf Kaninchen untersucht worden). Die Methode, deren er sich bediente (*Babo-Fresenius*, Modifikation von *Felletar*), ist recht mangelhaft. Es wäre noch zu erwähnen, daß der Ca-Gehalt in verschiedenen Organen oft bestimmt worden ist [*Heubner-Rona*[2]), *Jungmann-Samter*[3]), *Liesegang*[4]), *Hecht*[5]) u. a.], jedoch betraf diese Bestimmung nur gesunde oder mit Kalksalzen behandelte Tiere.

Ich habe eine Reihe von Versuchen mit dauernder Unterbindung des ganzen Nierenhilus von Kaninchen sowie einzelner Gefäße (Arterien und Venen) desselben angestellt, in welchen eine quantitative chemische Bestimmung des Kalkgehalts der Nieren ausgeführt wurde.

Im ganzen sind von mir 52 Versuche, in sechs Gruppen verteilt, angestellt worden. Die erste Gruppe enthält die Untersuchung normaler Kaninchennieren zwecks Bestimmung des Kalkgehalts derselben. Zur zweiten Gruppe gehören die Nieren mit Unterbindung des ganzen Hilus; zur dritten Gruppe mit Unterbindung der Nierenarterie allein; zur vierten Gruppe mit Unterbindung der Vene, zur fünften Gruppe mit Unterbindung des ganzen Hilus und Entkapselung der Niere; und endlich zur sechsten Gruppe die Nieren mit vikariierender Hypertrophie. Die Dauer der Versuche war in allen Gruppen die gleiche: 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 Tage. Die Unterbindungsoperation wurde streng aseptisch vorgenommen und die Niere nicht traumatisiert, da in allen Gruppen (außer der fünften) die intraperitoneale Operationsmethode angewandt wurde.

Für die quantitative Bestimmung des Kalks habe ich die Mikromethode *de Waards*[6]) angewandt. In der neueren Literatur wurde diese

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. **2**, 1882.
[2]) Diese Zeitschr. **93**, 1919.
[3]) Ebendaselbst **144**, 1924.
[4]) Ebendaselbst **145**, 1924.
[5]) Ebendaselbst **144**, 1924.
[6]) Ebendaselbst **97**, 1919.

Methode einer Kritik unterzogen. Eine Reihe von Forschern [*Blühdorn-Genck*[1]), *Hirth-Klotz*[2])] kommt auf Grund theoretischer Untersuchungen und Kontrolle an Blut und Testlösungen zu dem Schluß, daß diese Methode eine absolute Calciummenge nicht gibt, und daß ihre Genauigkeit den Angaben *de Waards* (0,002 mg CaO) nicht entspricht. Kritisch untersucht wurden außerdem einzelne Momente und die chemischen Begründungen dieser Methode. Ich habe die *Waard*sche Mikromethode an Testlösungen geprüft und die Angaben *Blühdorns* und *Genks* betreffs der Ungenauigkeit dieser Methode bestätigt, was mich veranlaßte, diese Methode zu modifizieren. Ich fand als Fehlergrenze 0,05 mg für Organsubstanzen (Nieren) und 0,01 mg CaO für Blut. Der wichtigste Nachteil *de Waards* Mikromethode besteht darin, daß bei Fällung des oxalsauren Kalks, wenn sich in der Lösung der Asche außer Kalk eine gewisse Menge von Magnesium und Eisen befindet, letztere mitsamt dem Kalk niedergeschlagen werden, wobei die Fällung des Kalks keine vollständige ist. Um dies zu vermeiden, habe ich eine Modifikation der Fällung des Ca aus Lösungen der Nierenasche in HCl eingeführt. Nach *de Waard* muß die Fällung folgendermaßen erreicht werden (l. c., S. 181). „... Das Röhrchen wird in ein kochendes Wasserbad gestellt, man fügt 0,5 ccm gesättigter Ammoniumoxalatlösung hinzu, dann so viel starkes Ammoniak, daß die Lösung, wenn man geschüttelt hat, danach riecht, und schließlich so viel Eisessig, daß man diesen auch riecht, wenn man es geschüttelt hat.“ Abgesehen von der Unzuverlässigkeit des Kriteriums *de Waards*, wonach die Menge von Essigsäure und Ammoniak bestimmt wird, welche notwendig ist, um mit der Fällung des Ca, die Fällung auch des $Mg^{\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ und der PO_4'''-Ionen zu vermeiden, führt die Fällung des Kalks, als Oxalat bei Vorhandensein genannter Ionen (Mg, Fe und PO_4) zur Fällung auch dieser. Bei Präzipitierung des Calciums nach *de Waard* erkläre ich mir den Chemismus der Reaktion des Niederschlagens folgendermaßen:

Bei Hinzufügung zur Lösung der Nierenasche in HCl-gesättigter Ammoniumoxalatlösung findet ein Ausfallen aus der Lösung von Ca, Mg und der in ihr enthaltenen Phosphate statt. Fügt man nun Eisessigsäure hinzu, so dürfte man die Auflösung der niedergeschlagenen Phosphate erwarten. Dies findet jedoch nicht statt, da die Wasserstoffionen des Lösungsmittels der Asche (stark dissoziierter Salzsäure) sich mit den Anionen der Essigsäure verbinden, nicht ionisierte Essigsäure bildend, welche nicht imstande ist, das Produkt der Dissolubilität der niedergeschlagenen Substanzen zur vollständigen Lösung zu bringen. Im Überschuß fördert sie das Ausfallen des Eisens, indem sie das Auflösungsmittel des letzteren, die Salzsäure ersetzt. Eine neue Hinzugabe stark dissoziierter Säuren würde das Gleichgewicht des Systems nach seiten der Auflösung des Niederschlags verändern, mit diesem aber auch das des Ca. Wenn endlich noch Ammoniak bis zum Auftreten des Geruchs hinzugefügt wird, wie dies *de Waard* fordert, so treten infolge von Alkalisierung der Lösung (auf Lackmus fand sich in 14 Fällen von 36 bei Vorhandensein des Ammoniakgeruchs eine neutrale Reaktion der Mitte, in den übrigen Fällen eine alkalische) alle Bedingungen ein, die ein Ausfallen der Phosphate fördern. Das Gesagte läßt sich durch Experimente bestätigen. Wenn ich bei Fällung des Calciums als Oxalat aus der Asche pathologischer Nieren genau *de Waard* folgte, erhielt ich

[1]) Diese Zeitschr. **135**, 1923.
[2]) C. r. de la Soc. de Biol. **89**, 1923.

jedesmal einen reichlichen gallertartigen Niederschlag, der sich nur bei Hinzugabe von Mineralsäuren löste. Bei Untersuchung dieses Niederschlags durch qualitative Analyse nach *Treadwell-Classen* wurden hier sowohl als im Filtrat $Ca^{\cdot\cdot}$, $Mg^{\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ und PO_4'''-Ionen gefunden, was ein Niederschlagen derjenigen Substanzen (außer Ca) bedeutet, deren Ausfallen verhütet werden mußte. Außerdem war auch die Präzipitation des Kalkes zweifellos keine vollständige.

Meine Modifikation der Fällung des Calciums besteht in folgendem: In einem Wasserbad ($\pm$ 70°) wird der salzsauren Lösung der Asche 1 bis 2 Tropfen eines Indikators zugegeben (Phenolphthalein oder Methylorange), sodann wird eine gesättigte Oxalsäurelösung eingeführt (1 ccm auf je 1 ccm der Aschenlösung), darauf starkes Ammoniak bis zur neutralen Reaktion. Darauf fügt man einige Tropfen Eisessigsäure hinzu [besser Essigsäureanhydrid $(CH_3CO)_2O$] bis zur sauren Reaktion, und dann erst gießt man den Überschuß der Ammoniumoxalatlösung hinzu, bis sich die Färbung des Indikators auf schwach-saurer einstellt. Der Chemismus der Reaktion ist hier folgender: Die Oxalsäure bindet sich nach ihrem Hinzufügen *in statu nascendi* mit den NH_4-Ionen, welche sich nach Einführung des Ammoniaks gebildet haben. Hierbei bildet sich oxalsaures Ammonium und ebenso Chlorammonium infolge der Wechselwirkungen von NH_4OH auf HCl; infolgedessen präzipitiert das in der Lösung enthaltene Magnesium nicht und das Ca verbindet sich nur mit dem entstandenen $(NH_4)_2C_2O_4$. Bei Hinzugabe von ionisierter Essigsäure in die schon neutralisierte Aschenlösung können die Phosphate nicht ausfallen und bleiben ungelöst. Der Überschuß des am Ende der Reaktion eingeführten $(NH_4)_2C_2O_4$ führt zu vollständiger Fällung des Calciums aus der Aschenlösung. Bei qualitativer Analyse des auf diese Art erhaltenen Satzes wurden die $Mg^{\cdot\cdot}$- und PO_4'''-Ionen kein einziges Mal vorgefunden, und nur in zwei Fällen (aus 20 stattgefundenen Analysen) wurden im Niederschlag Spuren von Eisen (mit KCNS) vorgefunden. Im Filtrat konnten die Ca-Ionen keinmal gefunden werden, was auf Vollständigkeit seiner Präzipitation schließen läßt.

Im übrigen folgte ich genau der Methode *de Waards*, wobei ich bemerken muß, daß die Benutzung eines farbigen Indikators bei Fällung des Ca dem weiteren Titrieren nicht hinderlich war, da der Niederschlag sorgfältig gewaschen wurde. Was aber einige Schwierigkeiten betrifft, die beim Waschen, Titrieren usw. möglich sind und die die Kritiker der Methode *de Waards* erwähnen, so konnten sie bei einiger Übung leicht vermieden werden.

I. Versuchsgruppe.

Kontrollversuche. Hierher gehören vier erwachsene, vollständig gesunde Kaninchen verschiedenen Gewichts. Untersucht wurden die rechten und die linken Nieren nach der von mir modifizierten *de Waard*schen Mikromethode. Diese Versuche wurden unternommen, um den Durchschnittsgehalt des Ca in normalen Nieren zu prüfen: Angaben darüber konnte ich nur bei *von Kóssa* finden. Indessen hat dieser Forscher nur zwei Kaninchennieren untersucht und gibt seine Daten — 0,0235 und 0,495 Proz. CaO — ohne Angabe des Gewichts des Tieres, des Wassergehalts usw. Die von mir gefundenen Daten finden sich in der Tabelle I:

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, daß der Normalgehalt des Ca in den Nieren nicht nur verschiedener Tiere, sondern auch in den Nieren desselben Tieres recht erheblichen Schwankungen unterworfen ist. Durchschnittlich

Tabelle I.

Nr. des Versuchs	Gewicht des Tieres g	Benennung der Niere	Gewicht der Niere g	Wassergehalt Proz.	Absoluter CaO-Gehalt der Niere mg	CaO-Gehalt der Niere Proz.
1	1570	r.	4,8	78,8	0,197	0,0193
		l.	5,0	76,3	0,419	0,0353
2	1970	r.	6,0	79,2	0,486	0,0389
		l.	5,5	78,3	0,190	0,0159
3	1560	r.	4,2	76,5	0,317	0,0321
		l.	4,0	76,2	0,160	0,0168
4	1480	r.	5,4	73,9	0,872	0,0620
		l.	5,0	76,1	0,426	0,0356

dürfte man, auf Grund angegebener Kontrollversuche als Normalgehalt **0,0259 Proz.** CaO bis **0,0880 Proz.** CaO annehmen.

II. Versuchsgruppe.

Zu dieser Versuchsgruppe sind 16 erwachsene Kaninchen verschiedenen Gewichts zu rechnen, denen die Art. und Vena renalis sowie der Harnleiter der linken Niere unterbunden wurde. Die Resultate dieser Versuche sind aus der Tabelle II ersichtlich.

Bei der Sektion der Kaninchen wurden schon früher bekannte (*Litten, von Werra, von Kóssa*) Veränderungen vorgefunden. Vom zehnten Tage an sind die Nieren grau, anämisch, fest, die Kapsel ist mit der Nierenoberfläche verschmolzen. Die 60tägigen Versuche ergaben eine auffällige Verminderung aller Größenverhältnisse, die Nieren wiesen Knochenkonsistenz auf, der Durchschnitt der Rinde ergab eine durchaus körnige Oberfläche, im Gebiet der Papillen stellten die Nieren eine glänzende, feste, graue Masse dar. Bemerkenswert ist, daß nach kurzer Unterbindungsdauer die Größe der linken unterbundenen Niere diejenige der rechten Niere übersteigt, wie dies schon *von Werra, Poscharissky* u. a. bemerkt hatten; am 5. bis 30. Tage nach der Unterbindung war in meinen Versuchen die Größe beider Nieren etwa die gleiche, dann nahmen die linken Nieren an ihrer Größe ab.

Aus den Daten der Tabelle II ist folgendes zu ersehen: Das Gewicht der linken Nieren ist in den ersten Tagen nach der Unterbindung erheblich höher als dasjenige der rechten. Nur ungefähr vom 30. Tage an fiel das Gewicht der linken Nieren in meinen Versuchen etwa um die Hälfte des Normalgewichts. Um etwa dieselbe Zeit begann das Gewicht der rechten Niere zu steigen. Der Wassergehalt der linken Nieren übertrifft den der rechten Nieren schon in den ersten Tagen nach der Unterbindung, um nach dem 30. Tage in das umgekehrte Verhältnis umzuschlagen. Die Untersuchung des Ca-Gehalts in den linken (unterbundenen) Nieren zeigt im ganzen ein stetiges Wachsen, entsprechend der Unterbindungsdauer. Vermehrter Kalkgehalt läßt sich schon vom zweiten Tage an beobachten, doch ist diese Erscheinung nicht die Regel, denn bei einem anderen Kaninchen derselben Gruppe und derselben Unterbindungsdauer der Gefäße erreicht die Menge des Ca kaum die Norm. Am 10. Tage nach der Unterbindung findet sich eine merkliche Vermehrung des Ca in den unterbundenen

Tabelle II.

Nr. des Versuchs	Versuchsdauer in Tagen	Gewicht des Tieres g	Benennung der Niere	Gewicht der Niere g	Wassergehalt Proz.	Absoluter CaO-Gehalt mg	CaO-Gehalt Proz.
1	2	1550—1500	l.	8,78	89,7	1,08	0,1204
			r.	5,01	86,3	0,09	0,0131
2		1100— 950	l.	9,01	89,5	0,20	0,0212
			r.	4,80	84,3	0,35	0,0467
3	5	2300	l.	12,15	78,1	1,00	0,0377
			r.	9,22	76,9	0,75	0,0353
4		1100—1080	l.	5,89	82,2	6,35	0,6060
			r.	4,60	77,4	0,29	0,0280
5	10	2100—2009	l.	7,90	76,0	7,02	0,3880
			r.	6,80	72,7	0,27	0,0146
6		1070	l.	7,00	83,5	3,50	0,3041
			r.	5,14	73,4	0,26	0,0234
7	20	1500	l.	6,81	80,2	2,31	0,0313
			r.	5,77	79,3	0,41	0,0343
8		1160—1145	l.	7,50	80,9	1,05	0,0156
			r.	5,32	77,1	0,82	0,0673
9	30	1660—1640	l.	4,72	72,5	23,11	1,7714
			r.	8,05	76,2	0,74	0,0664
10		1620—1600	l.	4,56	72,0	25,60	2,0155
			r.	8,33	78,8	0,76	0,0451
11	40	1720—1742	l.	4,25	74,4	17,46	1,6128
			r.	6,90	75,0	0,55	0,0319
12		1330—1400	l.	1,73	65,5	12,19	2,0496
			r.	6,25	77,8	1,84	0,1328
13	50	1500—1490	l.	4,20	70,3	44,73	3,7528
			r.	7,00	78,8	4,89	0,3251
14		1750—1765	l.	3,31	64,6	34,57	2,9363
			r.	7,30	77,7	5,50	0,3371
15	60	1360—1395	l.	4,90	59,2	47,40	2,3812
			r.	7,29	81,2	4,56	0,3340
16		1780—1810	l.	4,90	58,2	70,34	3,2716
			r.	9,05	78,3	5,17	0,2644

Nieren, doch des weiteren ist das Quantum nicht konstant und kann sogar unter die Norm fallen. Es ist also der Ca-Gehalt in den Nieren im Verlaufe der ersten Wochen nach der Unterbindung beträchtlichen Schwankungen unterworfen. Nur etwa nach dem 30. Tage und später findet sich ausgeprägte und stetige Vermehrung der Kalkmengen in den unterbundenen Nieren. Am 60. Tage war in meinen Versuchen die Menge des Calciums in den betreffenden Nieren um das 80- bis 120fache gegen die Norm gestiegen.

Die rechten Nieren weisen bis zum 40. Tage Schwankungen in den Schranken der Norm auf, und nur von da an findet Vermehrung des Kalkgehalts im Vergleich zur Norm statt. Zu erwähnen ist noch, daß sich bei allen Versuchen starke individuelle Schwankungen des Kalkgehalts bei verschiedenen Kaninchen innerhalb derselben Unterbindungsdauer finden. Es hängt also der Ablagerungsprozeß des Calciums in nekrotischen Nieren nicht nur von der Dauer der Unterbindung ab, sondern auch von den individuellen Eigenschaften des Versuchstieres, was schon *von Kóssa* bei seinen morphologischen Untersuchungen angegeben hat.

III. Versuchsgruppe.

Zu dieser Versuchsgruppe gehören acht erwachsene Kaninchen von verschiedenem Gewicht mit Unterbindung nur der Arterie der linken Niere. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle III angeführt:

Tabelle III.

Nr. des Versuchs	Versuchsdauer in Tagen	Gewicht des Tieres g	Benennung der Niere	Gewicht der Niere g	Wassergehalt Proz.	Absoluter CaO-Gehalt mg	CaO-Gehalt Proz.
17	2	2200—2000	l.	5,75	82,4	0,94	0,0933
			r.	6,06	77,8	0,25	0,0186
18	5	1600—1590	l.	5,87	75,4	10,34	0,7227
			r.	5,47	68,1	0,83	0,0477
19	10	1620—1590	l.	7,47	74,5	24,85	1,3060
			r.	7,07	73,9	0,11	0,0060
20	20	1970	l.	5,50	79,8	9,16	0,8261
			r.	6,80	82,0	0,51	0,0418
21	30	1400—1410	l.	4,64	71,9	13,03	1,0002
			r.	5,77	72,2	1,67	0,1041
22	40	1990—2110	l.	5,12	76,5	17,19	1,4328
			r.	7,60	84,9	0,87	0,0762
23	50	1810—1880	l.	4,64	70,3	33,17	2,4122
			r.	6,66	81,6	1,96	0,1600
24	60	2000—2200	l.	4,94	59,3	44,47	2,2272
			r.	7,89	81,6	4,33	0,2987

Aus der angeführten Tabelle III läßt sich schließen, daß nach Unterbindung der Nierenarterie allein dieselben Veränderungen eintreten, wie auch nach der Unterbindung der Arterie und Vene (zweite Versuchsgruppe). So sehen wir, daß das Gewicht der unterbundenen Nieren, ebenfalls gewachsen ist, bis etwa an dem zehnten Tage, worauf im Vergleich zu den rechten Nieren das umgekehrte Verhältnis eintritt. Dasselbe läßt sich vom Wassergehalt sagen, nur daß in dieser Versuchsgruppe die Unterschiede im Feuchtigkeitsgrad weniger groß sind, als in der vorhergehenden Gruppe. Die Größenmaße der rechten und linken Nieren sind denselben Schwankungen unterworfen, wie wir sie schon in der vorhergehenden Gruppe beobachten konnten.

Was den Ca-Gehalt in den unterbundenen Nieren dieser Versuchsgruppe anbetrifft, so finden sich hier in den ersten Tagen nach der Unterbindung ebenfalls beträchtliche Schwankungen, die aber eine Zunahme des Ca feststellen lassen. Vom 20. Tage an wird die Zunahme beträchtlich, und am 60. Tage ist die Menge des Kalks in den unterbundenen Nieren nach meinen Versuchen um das 100fache gegen die Norm gestiegen. In den rechten Nieren konnte man ungefähr vom 30. Tage an ebenfalls eine Zunahme des Ca-Gehalts konstatieren, die am 60. Tage das Zehnfache der Norm erreichte.

IV. Versuchsgruppe.

Hierher gehören acht erwachsene Kaninchen, bei welchen nur die Nierenvene unterbunden wurde. Diese Gruppe ist von besonderem Interesse, da hier die Bedingungen, unter denen das Nierengewebe abstirbt, sich von allen vorhergehenden Fällen unterscheiden. Der Verkalkungs-

prozeß entwickelt sich hier nach einer starken venösen Stauung; diese bedingt eine vermehrte Anhäufung von Kohlensäure im betreffenden Organ, welche besonders als „Kohlensäure-Acidose", wie *Hofmeister*[1]), *Wells*[2]), *Liesegang*[3]) meinen, auf den Verkalkungsprozeß wesentlichen Einfluß ausübt. Die erhaltenen Daten dieser Versuchsgruppe finden sich in Tabelle IV.

Tabelle IV.

Nr. des Versuchs	Versuchs-dauer in Tagen	Gewicht des Tieres g	Benennung der Niere	Gewicht der Niere g	Wasser-gehalt Proz.	Absoluter CaO-Gehalt mg	CaO-Gehalt Proz.
25	2	1620—1505	l.	10,39	90,4	3,56	0,3606
			r.	4,80	74,7	0,85	0,0701
26	5	1400—1210	l.	9,11	89,5	10,10	1,0647
			r.	6,08	78,1	0,30	0,0226
27	10	1320—1205	l.	7,15	82,0	14,76	1,1490
			r.	6,50	64,0	0,45	0,0335
28	20	2260—1945	l.	6,45	78,2	19,99	1,4297
			r.	6,05	75,7	1,90	0,1293
29	30	1880—1850	l.	5,45	78,0	21,53	1,7983
			r.	6,86	82,2	1,18	0,0960
30	40	2000—1970	l.	3,00	29,6	30,18	1,4296
			r.	8,22	77,0	2,99	0,1092
31	50	1770—1800	l.	4,82	68,9	41,82	2,7943
			r.	7,70	78,9	5,06	0,3026
32	60	1950—2005	l.	5,05	30,8	192,58	5,5121
			r.	10,02	81,3	5,17	0,2772

Bei der Sektion erwies es sich, daß die unterbundenen Nieren in den ersten Tagen nach der Ligatur (ungefähr bis zum 20. Tage) das Bild einer starken Stauungshyperämie darstellen. Die Nieren waren vergrößert, saftig, geschwollen, braunrot gefärbt. Nur vom 30. Tage an nach der Unterbindung waren die Nieren makroskopisch anämisch, atrophisch, mit zahlreichen Hämorrhagien durchsetzt. Die Größe der unterbundenen Nieren übertrifft die der rechten Nieren bei weitem.

Aus Tabelle IV ist ersichtlich, daß das Gewicht der unterbundenen Nieren bis zum 20. Tage höher ist, als das Gewicht der rechten Nieren. Vom etwa 30. Tage an tritt aber das Gegenteil auf. Die Untersuchung des Wassergehalts läßt uns zwei Momente hervorheben: 1. Bis zum 30. Tage ist der Prozentgehalt des Wassers der linken Niere höher als der der rechten. 2. Am 40. und 60. Tage nach der Unterbindung fällt der Feuchtigkeitsgrad der linken Nieren außerordentlich tief, beinahe um das Doppelte gegen die Norm.

Was den Ca-Gehalt der unterbundenen Nieren betrifft, so sehen wir in dieser Gruppe eine merkliche Zunahme des Kalks, sowohl in Prozenten als auch in absoluten Größen schon in den ersten Tagen nach der Unterbindung. Im Vergleich zu den vorigen Gruppen sind die Kalkablagerungen dieser Gruppe reichlicher. Es kann somit erschlossen werden, daß die venöse Stauung den Prozeß der dystrophischen Nierenverkalkung verstärkt.

---

[1]) Ergebn. d. Phys. **10**, 1910.
[2]) Journ. of med. res. **22**, 1910; **25**, 1911.
[3]) l. c.

Andererseits geht die Zunahme des Kalks in dieser Versuchsgruppe recht langsam und allmählich vor sich, ohne die Schwankungen, die wir in den oben besprochenen Fällen beobachteten. Vom Kalkgehalt der rechten Kontrollnieren läßt sich das oben Gesagte wiederholen: die Zunahme beginnt ungefähr vom 40. Tage.

V. Versuchsgruppe.

Es gehören hierher acht erwachsene Kaninchen, an denen außer dem Verschluß des ganzen Hilusgehalts der linken Niere die Entkapselung der Niere vorgenommen wurde. Die Dauer der Unterbindung blieb die gleiche wie in den übrigen Versuchsgruppen. Diese Versuchsgruppe hatte das Ziel, den Einfluß der Entkapselung der Niere, d. h. einer vollständigen Unterbrechung der Blutzufuhr auf den Verkalkungsprozeß zu untersuchen. Diese Frage haben schon *Blessig, von Werra, von Kóssa* (l. c.) morphologisch untersucht. Die Niere des Kaninchens bekommt von drei Seiten Blut zugeführt: aus der Art. renalis, aus der Art. spermatica interna, die vom Harnleiter nach unten zur Kapsel führt, und aus der Art. suprarenalis, die von oben zur Nierenkapsel herleitet. Es ist klar, daß bei Verschluß der wichtigsten Nährgefäße des Organs und bei Entkapselung der Niere diese von aller Zufuhr an Nahrung abgeschnitten ist. *Litten* meint, daß bei solchen Bedingungen (vollständige Unterbrechung der Blutzufuhr) eine völlige Verkalkung der Nieren nicht erreicht werden könne. Andere Forscher (*von Werra, von Kóssa*) im Gegenteil, lassen eine solche Möglichkeit gelten. Die von mir erhaltenen Daten dieser Versuchsgruppe folgen aus Tabelle V:

Tabelle V.

Nr. des Versuchs	Versuchsdauer in Tagen	Gewicht des Tieres g	Benennung der Niere	Gewicht der Niere g	Wassergehalt Proz.	Absoluter CaO-Gehalt mg	CaO-Gehalt Proz.
33	2	2470—1950	l.	12,20	78,2	45,14	1,7043
			r.	9,19	76,5	0,41	0,0190
34	5	1410—1400	l.	8,00	82,4	15,67	1,1155
			r.	6,15	78,2	0,27	0,0212
35	10	1080— 827	l.	6,68	82,0	29,40	2,4545
			r.	5,40	81,1	1,37	0,1347
36	20	1180— 795	l.	4,92	73,0	22,41	1,6893
			r.	5,50	79,4	0,94	0,0831
37	30	1600—1735	l.	4,87	79,1	20,95	2,0602
			r.	5,70	68,9	2,27	0,1894
38	40	1376—1400	l.	1,73	71,2	94,47	1,9483
			r.	6,37	79,8	1,47	0,1147
39	50	1900—2300	l.	3,98	4,5	5,87	1,5454
			r.	8,00	81,4	5,24	0,3533
40	60	1740—2200	l.	4,21	8,0	173,50	4,4833
			r.	7,95	76,6	5,72	0,3080

Das makroskopische Bild der unterbundenen Nieren dieser Versuchsgruppe unterscheidet sich nicht bei der Sektion von demjenigen der Nieren der zweiten und dritten Gruppe. Die Größen der rechten und linken Nieren weist auch keine wesentlichen Unterschiede auf.

Aus der Tabelle V ersehen wir, daß das Gewicht der unterbundenen Nieren dieselben Schwankungen aufweist, die oben beobachtet worden sind.

Der Wassergehalt der rechten und linken Nieren zeigt in den ersten Wochen nach der Unterbindung keine wesentlichen Differenzen. Erst ungefähr am 50. Tage nimmt der Wassergehalt der linken Nieren stark ab — er ist um das 20fache der rechten Kontrollnieren gegenüber verringert. Wodurch diese Erscheinung, welche schon in der vierten Versuchsgruppe bemerkt werden konnte (Versuchstier Nr. 30 und 32) bedingt ist, bleibt unklar.

Die Untersuchung des Ca-Gehalts der unterbundenen und entkapselten Nieren ergibt, daß hier ebenfalls eine Zunahme der Kalkmengen stattfindet, welche die Höhe der vorhergehenden Gruppen erreicht. Indessen geht diese Vermehrung unter großen individuellen Schwankungen vor sich, stärkere Petrifikationen wechseln mit schwächeren Ca-Ablagerungen ab. Die Veränderungen der rechten Nieren sind mit denen der besprochenen Gruppen identisch.

VI. Versuchsgruppe.

Zu dieser Gruppe gehören acht erwachsene Kaninchen verschiedenen Gewichts, denen die linke Niere exstirpiert wurde, um auf diese Art eine vikariierende Hypertrophie der rechten funktionierenden Niere zu erreichen. Die Lebensdauer der Versuchstiere blieb dieselbe wie in den übrigen Gruppen. Diese Versuchsgruppe muß als Kontrollgruppe angesprochen werden. In den oben besprochenen Gruppen entstand eine Hypertrophie der rechten Niere, und sie zeigte vom 30. bis 40. Tage an regelmäßig einen vermehrten Kalkgehalt. Da in allen vorhergehenden Versuchen die andere Niere nekrotisiert und verkalkt war, so konnte dadurch der Prozeß der vikariierenden Hypertrophie gewissermaßen beeinflußt werden. Dies veranlaßte mich, den Kalkgehalt der Kontrollniere auch bei Entfernung des paarigen Organs nachzuprüfen.

Die erhaltenen Daten sind in der Tabelle VI verzeichnet:

Tabelle VI.

Nr. des Versuches	Versuchsdauer in Tagen	Gewicht des Tieres g	Benennung der Niere	Gewicht der Niere g	Wassergehalt Proz.	Absoluter CaO-Gehalt mg	CaO-Gehalt Proz.
41	2	1700—1510	l.	6,02	78,3	0,54	0,0414
			r.	6,70	80,1	0,62	0,0473
42	5	1320—1110	l.	6,11	80,0	0,59	0,0485
			r.	5,50	78,1	0,34	0,0287
43	10	1500	l.	7,70	70,6	0,53	0,0419
			r.	7,00	79,8	0,30	0,0212
44	20	1402—1415	l.	5,89	80,8	—	—
			r.	6,07	81,6	0,30	0,0276
45	30	1200	l.	5,00	77,8	0,11	0,0099
			r.	5,20	78,9	0,70	0,0647
46	40	1170—1300	l.	4,40	75,1	0,41	0,0574
			r.	4,78	76,9	6,98	0,6346
47	50	1600—1710	l.	5,00	75,6	0,63	0,0517
			r.	6,93	81,4	4,85	0,3773
48	60	1750—2000	l.	8,28	78,5	1,04	0,0585
			r.	10,15	81,3	12,74	0,6740

Bei der Sektion der Tiere dieser Versuchsgruppe war die erhaltene Niere makroskopisch im Vergleich zur Norm unverändert geblieben, und

nur ungefähr vom 40. bis 50. Tage an ließ sich eine Vergrößerung im Vergleich zur linken exstirpierten Niere bemerken. Am zweiten Tage nach der Exstirpation fanden wir folgende Dimensionen der Nieren: linke exstirpierte Niere: 2,7 × 2,0 × 0,9 cm; rechte erhaltene Niere: 3,0 × 1,9 × 1,0 cm. Am 60. Tage ergab sich: linke Niere 2,9 × 1,7 × 1,0 cm und rechte Niere 4,7 × 1,9 × 2,8 cm. Die Betrachtung der Tabelle VI zeigte uns, daß eine Differenz am Gewicht der rechten und linken Nieren erst vom 50. Tage an bemerkbar wird. Dasselbe läßt sich vom Wassergehalt sagen. Was den Kalkgehalt betrifft, so findet sich etwa vom 30. Tage an nach Exstirpation der linken Niere in der rechten hypertrophierten Niere eine merkliche Zunahme des Kalkes, im Vergleich zur Norm. Die Zunahme des Ca in der hypertrophierten Niere steigt stetig und der Kalkgehalt erreicht in meinen Versuchen am 60. Tage das Zehnfache der Norm. Somit ist die Vermehrung des Kalkgehalts der Nieren auch bei der reinen Form der vikariierenden Hypertrophie, d. h. nach der Entfernung des paarigen Organs zu beobachten.

Zusammenfassung.

Die angeführten Daten der chemischen Nierenuntersuchung auf Kalkgehalt hin beziehen sich einerseits auf den Prozeß der Nekrose und Verkalkung nach Unterbindung der Blutgefäße, andererseits auf den Prozeß der vikariierenden Hypertrophie nach Entfernung des paarigen Organs.

Fassen wir den ersten der genannten Prozesse ins Auge, so sehen wir, daß unabhängig davon, ob alle Gefäße der Niere unterbunden waren oder nur die Arterie allein, bzw. die Vene, auch ob die Niere entkapselt wurde oder nicht, die Veränderungen der operierten Niere an Gewicht, Wassergehalt und Ca-Gehalt im Prinzip die gleichen sind und können folgendermaßen formuliert werden:

1. In den ersten Perioden nach allen diesen Operationen findet eine Zunahme des Volumens und des Gewichts der Niere statt, desgleichen eine Zunahme des Wassergehalts und eine anfänglich geringe und beträchtlichen Schwankungen unterworfene Zunahme des Kalkgehalts.

2. Innerhalb der ersten Periode nach der Gefäßunterbindung läßt sich nebst der Nekrose hauptsächlich eine Quellung der Nieren beobachten, was auch den Angaben der Morphologen entspricht.

3. Das dem wirklich so ist, läßt sich auch dadurch beweisen, daß diese letzte Erscheinung bei Versuchen, in denen venöse Stauung hervorgerufen wurde, stärker ausgeprägt ist, dagegen schwächer bei Entkapselung der Niere, wenn die Wege der Flüssigkeitszufuhr durch die Kollateralgefäße abgeschnitten sind.

4. Das nekrotische und gequollene Nierengewebe besitzt noch keine stark ausgeprägte Fähigkeit zur Adsorption und Bindung des Kalkes. Die Anhäufung desselben in größeren Mengen geschieht erst

später, was am besten an der zweiten und dritten Versuchsgruppe beobachtet werden konnte.

5. Die Fähigkeit des nekrotischen Nierengewebes, Kalk zu adsorbieren, tritt erst nach Verschwinden der Quellung ein.

6. Eine andere Erscheinung, die ich beobachten konnte, ist eine erhöhte (im Vergleich zu anderen Versuchsgruppen) Adsorption des Ca in den Nieren mit alleiniger Unterbindung der Nierenvene. Diese Tatsache spricht zugunsten der Anschauung *Hofmeisters* über die Bedeutung der Ansammlung von Kohlensäure in den Geweben für den Gang der dystrophischen Verkalkung.

Schließlich ist bei der vikariierenden Nierenhypertrophie der Kalkgehalt des Nierengewebes gesteigert, und zwar unabhängig davon, ob die andere Niere entfernt oder durch Gefäßunterbindung ausgeschaltet ist.

Studien über parenterale Resorption.

IV. Mitteilung:

Die Beeinflussung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau durch einige adsorptionsfähige Substanzen.

Von

N. Okuneff.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie an der Militär-Medizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 30. November 1925.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Meine unlängst veröffentlichten Versuche[1]) zeigten, daß die Resorption des Farbstoffs Trypanblau aus der Bauchhöhle auf zwei Wegen beeinflußt werden kann: 1. durch die Änderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Farbstofflösung, 2. durch die Wirkung auf den Resorptionsapparat selbst. Vom praktischen Standpunkt aus ist die erste Möglichkeit, die intraperitoneale Resorption des kolloidalen Farbstoffs zu beeinflussen, besonders interessant. Denn dadurch ist man imstande, die intraperitoneale Resorption ohne besondere Schädigungen des Resorptionsapparats — des lebendigen Peritoneums — zu ändern. Die intraperitoneale Resorption des Farbstoffs Trypanblau könnte z. B. dadurch abgeschwächt werden, daß ein erheblicher Teil desselben in der Bauchhöhle selbst durch irgend einen gleichzeitig eingeführten Stoff zurückgehalten würde. Somit liegt der Gedanke nahe, daß in erster Linie *adsorbierende Substanzen* eine Abschwächung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau verursachen könnten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Vertreter verschiedener adsorptionsfähiger Substanzen in dieser Beziehung nachzuprüfen.

Das Interesse für den Gebrauch der Adsorbentia zur Abschwächung der Resorption von verschiedenen Giften erwuchs hauptsächlich aus den bekannten Untersuchungen von *Stumpf*[2]) und *Biltz*[3]). Seitdem sind zahl-

---

[1]) Diese Zeitschr. **161**, 1, 1925.

[2]) *Stumpf*, Über ein zuverl. Verfahren bei d. Cholera as. Würzburg 1906.

[3]) *Biltz*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **37**, 3138, 1904.

reiche Beobachtungen gemacht worden vor allem betreffs der Resorption der Gifte vom Magen aus bzw. aus dem Darmkanal [*Wiechowski*[1]), *Lichtwitz*[2]), *Hedin*[3]), *Boruttau*[4]), *Adler*[5]), *Thurner* und *Münzer*[6]), *Wolff-Eisner*[7]), *Weiss*[8]) und vielen anderen], die zur Erscheinung einer neuen Heilmethode, der „Adsorptionstherapie" führten [siehe auch *Bechhold*[9]) und *Schade*[10])].

Nun ist aber in dieser Beziehung die parenterale Resorption verhältnismäßig wenig nachgeforscht worden. *Stumpf*[11]) wies darauf hin, daß bei der Behandlung der infizierten Wunden mit Bolus dieselben schneller heilen, zweifellos infolge der Adsorption verschiedener toxischer Substanzen und Bakterien [vgl. hierzu *Lichtwitz*[12]), *Bechhold*[13]), *Wilucki*[14]) u. a.]. Sehr interessant sind ferner die experimentellen Untersuchungen von *Wiechowski*[15]), der zeigen konnte, daß an Kohle adsorbiertes Diphtherietoxin aus der Bauchhöhle und aus dem subkutanen Bindegewebe fast gar nicht resorbiert wird: in diesen Bedingungen vertragen die Tiere eine mehrhundertfache tödliche Dosis des Giftes. Endlich fand *Wiechmann*[16]), daß die parenterale Resorption von NaCl beim Frosch unter dem Einfluß von Gummi arabicum stark gehemmt wird.

Die Ansichten verschiedener Forscher über den Mechanismus des Schutzes der kolloidalen und adsorbierenden Stoffe bei „parenteraler Adsorptiontherapie" sind nicht ganz einig. Während mehrere Forscher [*Wiechowski*[15]), *Lichtwitz*[12]), *Bechhold*[13]), *Schade*[17]) u. a.] das Hauptgewicht auf die Erscheinungen der reinen Adsorption legen, sind *Pfeiffer* und *Staudenath*[18]) der Meinung, daß dabei die Speicherung der eingeführten kolloidalen Stoffe im sogenannten reticulo-endothelialen Apparat die

---

[1]) *Wiechowski*, Münch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 8, S. 348; Wien. klin. Wochenschr. 23, 307, 1910; Verh. d. Kongr. XXXI. f. inn. Med. 1914 (Ref. Zentralbl. f. inn. Med. 35, 531, 1914); Therap. d. Gegenw. 63, 121, 1922.

[2]) *Lichtwitz*, Therap. d. Gegenw. 49, 542, 1908; Deutsch. med. Wochenschrift 43, 1360, 1917.

[3]) *Hedin*, Zeitschr. f. phys. Chem. 50, 497, 1907.

[4]) *Boruttau*, diese Zeitschr. 43, 418, 1912.

[5]) *Adler*, Verh. d. 31. Kongr. f. inn. Med. 1914; ref. Zentralbl. f. inn. Med. 35, 531, 1914.

[6]) *Thurner* und *Münzer*, Therap. d. Gegenw. 57, 16, 1916.

[7]) *Wolff-Eisner*, ebendaselbst 56, 92, 1915.

[8]) *Weiss*, Deutsch. med. Wochenschr. 50, 113, 1924.

[9]) *Bechhold*, Die Kolloide in Biologie und Medizin 1922, S. 391. Steinkopf.

[10]) *Schade*, Die physikalische Chemie in der inneren Medizin, 3. Aufl., 1923, S. 274. Steinkopf.

[11]) *Stumpf* Münch. med. Wochenschr. 1898, Nr. 46.

[12]) *Lichtwitz*, Therap. d. Gegenw. 49, 542, 1908.

[13]) *Bechhold*, l. c.

[14]) *Wilucki*, Münch. med. Wochenschr. 1914, Nr. 49.

[15]) *Wiechowski*, Verh. d. XXXI. Kongr. f. inn. Med. 1914; Wien. klin. Wochenschr. 23, 307, 1910.

[16]) *Wiechmann*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 33.

[17]) *Schade*, l. c.

[18]) *Pfeiffer* und *Staudenath*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 37, 184, 1923.

größte Rolle spielt. — Weitere Studien über die Beeinflussung der parenteralen Resorption durch adsorptionsfähige Substanzen sind somit vollständig berechtigt.

Eigene Untersuchungen.

Methodik.

Die Methodik der Einführung der Farbstofflösung, der Blutentnahme und -untersuchung war dieselbe wie in meinen früheren Arbeiten[1]). Blutuntersuchungen wurden 30 Minuten, 1, 3 und 6 Stunden nach der Injektion des Farbstoffs vorgenommen. In allen Fällen wurden von mir parallele Versuche unter normalen und abnormen Bedingungen an einem und demselben Tiere angestellt, wobei zwischen den einzelnen Farbstoffinjektionen eine Zeitperiode von 8 bis 10 Tagen verfloß. Als Versuche unter normalen Bedingungen bezeichne ich solche, in welchen gesunden erwachsenen Kaninchen 1proz. Trypanblaulösung (in destilliertem Wasser) in die Bauchhöhle eingespritzt wurde. Nach 8 bis 10 Tagen wurden denselben Versuchstieren ebenso große Farbstoffmengen injiziert, diesmal jedoch zusammen mit irgend einem Adsorbens. Als Adsorbentia bzw. adsorptionsfähige Substanzen wurden folgende Stoffe angewendet: 1. *Tierkohle* (offizinelles Carboossium), 2. *Bolus alba* (offizinelles Präparat), 3. *Gelatine* (*Merck*), 4. *Gummi arabicum* (offizinelles Präparat) und 5. *Casein* (*Merck*). Die beiden ersten Stoffe sind bekannte Adsorbentia. Gelatine und Gummi arabicum wählte ich als hydrophile Kolloide, welche nach einigen Literaturangaben imstande sind, die Farbstoffe zu adsorbieren und die Resorption zu verzögern [*Wiechmann*[2]), *Weyl*[3]), *Knaffl-Lenz* und *Nogaki*[4]) u. a.]. Casein war als Repräsentant von Eiweißstoffen interessant [vgl. *Bechhold*[5])]. Die genannten Stoffe wurden zum Versuche in folgender Form gebraucht: 1. Aus dem offizinellen Präparat *Carboossium* (Pulver) wurde eine 15proz. Suspension im destillierten Wasser hergestellt, die durch Gaze (drei bis vier Schichten) filtriert wurde. Das Filtrat enthielt, wie es spezielle Bestimmungen gezeigt haben, etwa 4 bis 5 Proz. Kohle. Vor der Einspritzung mußte die Suspension kräftig geschüttelt werden[6]). 2. Aus dem offizinellen Präparat *Bolus alba* wurden ex tempore 20proz. Suspensionen hergestellt und nach Schütteln filtriert. Das Filtrat enthielt nach speziellen Bestimmungen etwa 8 bis 10 Proz. Bolus alba. Das Schütteln der Suspensionen unmittelbar vor dem Gebrauche war unbedingt nötig. 3. *Gelatine* und *Gummi arabicum* wurde in Form von 5 bis 10proz. Lösungen in destilliertem Wasser gebraucht (Auflösung ex tempore). 4. Zur Herstellung einer *Casein*lösung (10proz.)

---

[1]) Diese Zeitschr. **147**, 103, 1924; **149**, 534, 1924; **161**, 1, 1925.

[2]) *Wiechmann*, l. c.

[3]) *Weyl*, Kolloidzeitschr. **32**, H. 5, 1923.

[4]) *Knaffl-Lenz* und *Nogaki*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **105**, 109, 1925.

[5]) *Bechhold*, l. c., S. 156.

[6]) Bekanntlich stellt *Wiechowski* (l. c.) an eine adsorptiv gute Tierkohle mehrere Anforderungen. Da aber das Ziel meiner Versuche war, nur nachzuweisen, ob und inwiefern die Tierkohle überhaupt imstande ist, die intraperitoneale Resorption eines kolloidalen Farbstoffs zu beeinflussen, konnte die spezielle Nachprüfung des Kohlenpräparats (s. *Wiechowski*, l. c.) weggelassen werden.

mußte man zum destillierten Wasser etwas Alkali (1 ccm n/10 NaOH-Lösung auf 4 ccm 10proz. Caseinlösung in destilliertem Wasser) hinzufügen. Alle Suspensionen und Lösungen wurden in der Menge von 5 bis 40 ccm in die Bauchhöhle der Versuchskaninchen injiziert, und zwar entweder *im Gemisch mit der Farbstofflösung* oder *getrennt von ihr*. In letztem Falle wurden die genannten Substanzen ½ bis 1 Stunde *vor* oder *nach* der Farbstoffinjektion eingeführt.

1. Versuche mit der Tierkohle.

Hierzu gehören folgende drei Versuchsgruppen.

1. Gruppe (drei Versuche). Den Versuchstieren wurden *Gemische* aus gleichen Mengen (5 ccm) 1proz. Trypanblaulösung und 5proz. Tierkohlesuspension eingeführt.

2. Gruppe (fünf Versuche). Den Kaninchen wurden 5 ccm der 1proz. Trypanblaulösung injiziert und *sofort nach* der Farbstoffinjektion 5, 20, 40 ccm 4- bis 5proz. Tierkohlensuspension eingeführt.

3. Gruppe (zehn Versuche). In den ersten fünf Versuchen wurden 25 bis 30 ccm 5proz. Tierkohlesuspension 30 bzw. 60 Minuten *vor*, in fünf anderen Versuchen die gleichen Mengen der Suspension *nach* der Farbstoffinjektion (5 ccm 1proz. Trypanblaulösung) eingeführt.

In den Versuchen der ersten Gruppe war die Beeinflussung der intraperitonealen Resorption des Farbstoffs Trypanblau durch die Tierkohle eine außerordentlich starke. Im Blute der hierzugehörigen Versuchstiere konnte nämlich während der ersten 6 Stunden nach der Injektion trotz der sorgfältigsten Untersuchungen *keine Spur von Trypanblau* entdeckt werden. Bei der Obduktion der Tiere wurden in der Bauchhöhle nur aus Tierkohle bestehende Niederschläge gefunden, die augenscheinlich den Farbstoff gänzlich adsorbiert hatten. Denn das Peritoneum selbst war in diesen Fällen mit Trypanblau gar nicht gefärbt[1]). Es sei bemerkt, daß die zur Injektion in die Bauchhöhle angewandte Mischung aus Farbstofflösung und Tierkohle im Versuch in vitro eine vollständige Adsorption des Farbstoffs durch die Tierkohle zeigte. Das eingetauchte Papierstreifchen färbte sich nämlich in dieser Mischung gar nicht.

In den Versuchen der *zweiten Gruppe* erwies es sich, daß die Beeinflussung der Trypanblauresorption durch die Tierkohle im großen Maße davon abhängig ist, wie groß die Menge der Tierkohlesuspension im Vergleich zu der Menge der eingeführten Farbstofflösung war. Wenn nämlich sofort nach der Einführung von 5 ccm Farbstofflösung eine *ebenso große* (5 ccm) *Menge* der Tierkohlesuspension eingeführt wurde, enthielt das Blut der Versuchstiere fast ebensoviel Farbstoff, wie im Kontrollversuch, d. h. eine Verlangsamung bzw. Abschwächung der

[1]) Unter normalen Bedingungen färbt sich bei den Kaninchen das Bauchfell nach den intraperitonealen Trypanblauinjektionen schon in den ersten Stunden tief blau (vgl. meine Versuche, diese Zeitschr. **149**, **534**, **1924**).

Resorption wurde nicht beobachtet. Das eben Gesagte ist leicht aus der Kurve Abb. 1 zu ersehen.

Demgegenüber fand ich in Versuchen, wo sofort nach der Einführung von 5 ccm Farbstofflösung *größere* (25 bis 40 ccm) *Mengen* 5proz. Tierkohlesuspension injiziert wurden, eine deutliche Verlangsamung der Farbstoffresorption. Diese letztere war dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoffgehalt im Blute im Vergleich zu der Norm sehr klein war (s. hierzu Kurve Abb. 2).

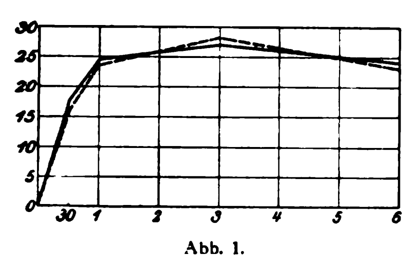


Abb. 1.

Auf der Abszisse sind die Stunden abgetragen, auf der Ordinate der Prozentgehalt an Farbe im Gesamtblut, bezogen auf die injizierte Farbenmenge. Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen), ausgezogene Kurve = Menge von Trypenblau im Blute nach der Injektion von 5 ccm 5 proz. Tierkohlesuspension sofort nach der Injektion von 5 ccm 1 proz. Farbstofflösung.

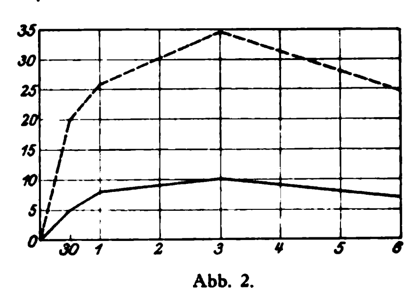


Abb. 2.

Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen), ausgezogene Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion von 30 ccm 5 proz. Tierkohlesuspension sofort nach der Injektion von 5 ccm 1 proz. Farbstofflösung.

Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

Dieser Unterschied in den einzelnen Versuchsresultaten der zweiten Gruppe wird durch folgende Überlegung verständlich. In meinen Versuchen wurden Trypanblaulösung und Tierkohlesuspension möglichst in eine und dieselbe Stelle der Bauchhöhle injiziert. Und doch konnte eine völlige *Vermischung* beider Flüssigkeiten in der Bauchhöhle nicht stattfinden, denn die Bauchhöhle wird durch die Bauchorgane in zahlreiche voneinander getrennte Räume geteilt, die die Vermischung der eingeführten Lösungen verhindern. Nun hat mir die Obduktion der Versuchstiere der zweiten Gruppe gezeigt, daß tatsächlich in Versuchen, wo die Menge der Tierkohlesuspension relativ gering war, beide eingeführten Flüssigkeiten (Farbstofflösung und Tierkohlesuspension) sich entfernt voneinander, oft ganz isoliert, befanden. Ganz anders in Versuchen, wo die Menge der Tierkohlesuspension relativ groß war. Hier fand ich in der Bauchhöhle beide eingeführten Flüssigkeiten stets miteinander vermischt.

Die Versuche der *dritten Gruppe* zeigen, daß die Tierkohlesuspension auch in dem Falle die intraperitoneale Farbstoffresorption beeinflußt, wenn sie getrennt von der Farbstofflösung, nämlich

30 Min. *vor* oder *nach* der Einführung dieser letzteren injiziert wird. In den hierzugehörigen Versuchen wurden für den Farbstoffgehalt des Blutes stets geringere Werte gefunden, als in der Norm (s. dazu Kurven Abb. 3 und 4).

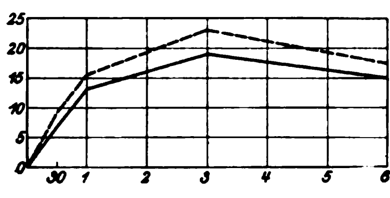


Abb. 3.
Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen), ausgezogene Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion von 30 ccm 5 proz. Tierkohlesuspension 30 Minuten *vor* der Injektion von 5 ccm 1 proz. Farbstofflösung.
Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

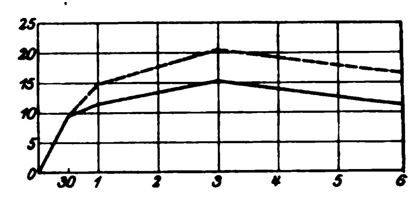


Abb. 4.
Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen), ausgezogene Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion von 30 ccm 5 proz. Tierkohlesuspension 30 Minuten *nach* der Injektion von 5 ccm 1 proz Farbstofflösung.
Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

Die Tierkohle scheint die Resorption etwas stärker zu beeinflussen, wenn sie *nach* dem Farbstoffe eingeführt wird (vgl. hierzu Kurven der Abb. 3 und 4).

In Versuchen der dritten Gruppe, wo zwischen den Injektionen von Farbstofflösung und Tierkohlesuspension eine Zeitperiode von 60 Min. verflossen war, war die Abschwächung der Resorption eine sehr geringe. Injizierte man die Kohle eine Stunde *nach* der Farbstoffinjektion, so wurden von mir bei Versuchstieren fast ebenso große Farbstoffmengen im Blute gefunden, wie unter normalen Bedingungen. Dieses Versuchsresultat ist ganz verständlich, da, wie ich es zeigen konnte[1]), zu dieser Zeit schon der größte Teil des Farbstoffs ins Blut resorbiert ist. In Versuchen, wo die Tierkohle eine Stunde *vor* der Farbstofflösung injiziert wurde, konnte ebenfalls nur eine sehr geringe Verminderung des Farbstoffgehalts im Blute im Vergleich zu der Norm konstatiert werden (s. hierzu Kurve Abb. 5).

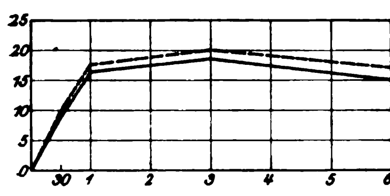


Abb. 5.
Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen), ausgezogene Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion von 30 ccm 5 proz. Tierkohlesuspension 1 Stunde vor der Injektion von 5 ccm 1 proz. Farbstofflösung.
Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

Somit erlauben die von mir mit der Tierkohle ausgeführten Versuche den Schluß zu ziehen, daß *mit Hilfe der Tierkohle eine Verlang-*

[1]) Diese Zeitschrift **147**, 103, 1924; **149**, 534, 1924.

samung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau erzielt werden kann. Dabei erwies es sich, daß aus Gemischen von Farbstofflösung und Tierkohlesuspension der Farbstoff gar nicht resorbiert wird. Bei getrennter Einführung von Farbstofflösung und Tierkohlesuspension tritt eine Verlangsamung der Resorption ein, nur falls die Tierkohle etwa eine Stunde nach bzw. vor der Farbstoffinjektion eingeführt wird.

2. *Versuche mit Bolus alba.*

Im ganzen wurden von mir sechs Versuche mit Bolus alba angestellt, und zwar: zwei Versuche mit der Einführung von Gemischen aus gleichen Mengen (5 ccm) von 1proz. Farbstofflösung und von der 8- bis 10proz. Bolus-alba-Suspension; ein Versuch mit der Einführung von 30 ccm 8- bis 10proz. Bolus-alba-Suspension sofort nach der Einführung von 5 ccm 1proz. Farbstofflösung; zwei Versuche mit der Einführung von 30 ccm 8- bis 10proz. Suspension von Bolus alba 30 Minuten und 1 Stunde *vor* der Farbstoffinjektion (5 ccm 1proz. Lösung) und endlich ein Versuch mit der Einführung von 30 ccm der Bolus-Suspension 30 Minuten *nach* der Einführung des Farbstoffs.

Die Versuche mit Bolus alba zeigten, daß auch dieser Stoff eine Verlangsamung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau verursacht. Es wurden nämlich in Versuchen mit Einführung von Bolus alba stets kleinere Farbstoffwerte im Blute gefunden, als unter normalen Bedingungen. Dabei war, ähnlich wie ich es in Versuchen mit der Tierkohle beobachtete, die Wirkung des adsorbierenden Stoffes in dem Falle am stärksten ausgeprägt, wenn er im Gemisch mit dem Farbstoff in den Peritonealsack eingeführt wurde. Das Gesagte ist leicht aus der Kurve Abb. 6 zu ersehen.

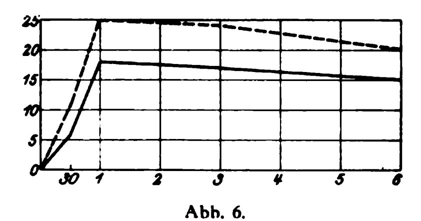


Abb. 6.

Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen). ausgezogene Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion eines Gemisches aus 5 ccm 1 proz. Farbstofflösung und 5 ccm 10 proz. Bolus-alba-Suspension.
Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

Die Beeinflussung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau durch Bolus alba ist bedeutend schwächer ausgeprägt, als durch die Tierkohle (vgl. Abb. 2 und 6). Ähnliche Beobachtungen hat *Straus*[1]) gemacht betreffs der HCl und Pepsinadsorption durch Bolus alba und Tierkohle. Sehr schwach war die resorptionshemmende Wirkung von Bolus alba in dem Falle, wenn dieser Stoff *getrennt* vom Farbstoffe eingeführt wurde. Falls dabei die Zeitperiode zwischen den Einführungen

[1]) *Straus*, Deutsch. med. Wochenschr. 42, 36, 1916.

von Farbstoff und Adsorbens 60 Minuten betrug, war der Unterschied der Farbstoffmengen im Blute im Vergleich zu Kontrollversuchen verschwindend klein (s. hierzu Kurve Abb. 7).

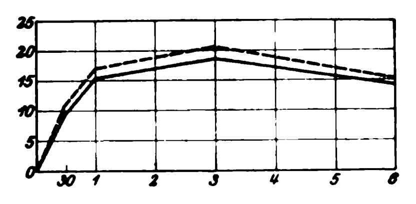


Abb. 7.

Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen), ausgezogene Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion von 30 ccm 10 proz. Bolussuspension 1 Stunde nach der Injektion von 5 ccm 1 proz. Farbstofflösung.

Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

Nichtsdestoweniger folgert aus meinen Versuchen mit Bolus alba, daß *auch mit Hilfe dieser Substanz eine Verlangsamung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau erzielt werden kann. Dabei ist aber die Wirkung von Bolus alba nicht so stark wie die der Tierkohle. Ebenso wie die letztgenannte Substanz wirkt Bolus alba am stärksten in dem Falle, wenn sie im Gemisch mit dem Farbstoff eingeführt wird.*

3. *Versuche mit Gelatine und Gummi arabicum.*

Bei neun Kaninchen wurde die intraperitoneale Resorption von Trypanblau unter normalen Bedingungen bestimmt. 10 Tage nachher wurde denselben Versuchstieren die gleiche Farbstoffmenge (5 ccm einer 1 proz. Lösung) in die Bauchhöhle eingeführt, jedoch diesmal nicht in Wasser-, sondern in 5 proz. Gelatine- (fünf Versuche) und 10 proz. Gummi-arabicum-Lösung (vier Versuche).

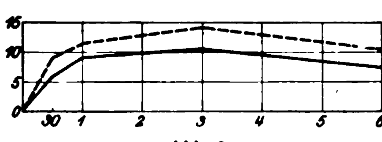


Abb. 8.

Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen), ausgezogene Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der Einführung von 5 ccm 1 proz. Trypanblaulösung in 5 proz. Gelatine.

Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

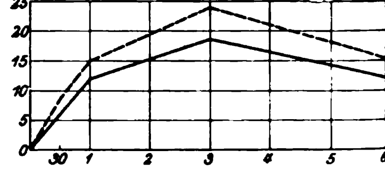


Abb. 9.

Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen), ausgezogene Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der Einführung von 5 ccm 1 proz. Trypanblaulösung in 10 proz. Gummi-arabicum-Lösung.

Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

Wie es die angeführten Kurven (siehe Abb. 8 und 9) zeigen, war der Farbstoffgehalt des Blutes in Versuchen mit der Einführung von Trypanblau in Gelatine- und Gummilösungen bedeutend kleiner als in Versuchen mit der Injektion von wässerigen Trypanblaulösungen. Die Anwesenheit beider genannten hydrophilen Kolloide scheint die Resorption des kolloidalen Farbstoffs zu verhindern. Der resorptionsverzögernde Effekt von Gelatine und Gummi ist aber nicht so stark

wie der der Tierkohle (vgl. Abb. 8, 9 mit Abb. 2, 6) und etwa der Wirkung von Bolus alba gleich.

In der Literatur trifft man auch andere Beispiele der resorptionsverzögernden Eigenschaften von Gelatine und Gummi arabicum. So hat *Wiechmann*[1]) beobachtet, daß Gummi arabicum die Resorption von NaCl aus dem Rücklymphsack des Frosches verzögert. Neuerdings fanden *Knaffl-Lenz* und *Nogaki*[2]), daß Gummi arabicum die Resorption von verschiedenen Salzen aus der ausgeschalteten Darmschlinge verlangsamt. Meine Befunde zeigen, daß *die resorptionsverzögernde Eigenschaft der Gelatine und des Gummi arabicum sich auch auf die parenterale Resorption kolloidaler Stoffe erstreckt.*

4. Versuche mit Casein.

An vier Versuchstieren wurden von mir die Resorptionserscheinungen des Farbstoffs Trypanblau aus der Bauchhöhle unter normalen Bedingungen studiert und 9 Tage danach den Tieren die gleichen Farbstoffmengen (5 ccm 1proz. Lösung) in einer 10proz. Caseinlösung intraperitoneal eingeführt.

Aus der Abb. 10 sieht man, daß der Farbstoffgehalt des Blutes im Versuch mit der Einführung einer Trypanblaulösung mit Zusatz von Casein bedeutend kleiner ist als im Versuch, wo wässerige Lösung von Trypanblau gebraucht wurde. Somit verursacht auch Casein *eine bedeutende Verlangsamung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau.* Dabei ist die resorptionsverzögernde Wirkung des genannten Stoffes stärker als diejenige anderer von mir untersuchten Substanzen (die Tierkohle ausgenommen)[3]).

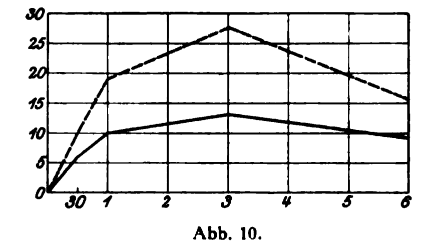


Abb. 10.

Punktierte Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der ersten Injektion (normale Bedingungen). ausgezogene Kurve = Menge von Trypanblau im Blute nach der Einführung von 5 ccm 1 proz. Trypanblaulösung in 10 proz. Caseinlösung.

Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

Zusammenfassung.

Die Ergebnisse sämtlicher oben angeführten Versuchsgruppen lauten ganz gleichartig und zeigen, daß mit Hilfe der von mir angewandten Substanzen — Tierkohle, Bolus alba, Gelatine, Gummi

---

[1]) *Wiechmann*, l. c.

[2]) *Knaffl-Lenz* und *Nogaki*, l. c.

[3]) Die Beimengung von Alkali zu der Caseinlösung (siehe Methodik, S. 253) spielte dabei keine Rolle, da nach meinen früheren Untersuchungen (diese Zeitschr. 161, 1, 1925) die n/50 NaOH-Lösung keine Verlangsamung, sondern eher eine Beschleunigung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau nach sich ruft.

arabicum und Casein — eine Verzögerung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau erzielt werden kann. Jedoch ist die resorptionsverzögernde Wirkung der einzelnen untersuchten Substanzen nicht gleich stark ausgeprägt. Eine besonders starke Resorptionsverlangsamung ruft die Tierkohle nach sich, schwächer wirkt in derselben Richtung Casein und Bolus alba, noch schwächer Gelatine und Gummi arabicum. In der Regel beeinflussen die genannten Substanzen die Resorption am stärksten in dem Falle, wenn sie im Gemisch mit dem Farbstoff eingeführt werden. Besonders deutlich konnte dieser Umstand für die Tierkohle gezeigt werden. Nichtsdestoweniger ist aber die resorptionsverzögernde Wirkung der untersuchten Substanzen auch in dem Falle ganz deutlich ausgeprägt, wenn zwischen dem Moment der Farbstoff- und Adsorbenteninjektion eine Zeitperiode von etwa 30 Minuten verflossen ist. Nur muß dabei die relative Menge des Adsorbens verhältnismäßig groß sein, damit die eingeführten Lösungen sich mit ihm in der Bauchhöhle gut vermischen können (vgl. die Versuche mit der Tierkohle).

Aus den von mir untersuchten Substanzen ist die resorptionsverzögernde Wirkung der bekannten Adsorbenten — Tierkohle und Bolus alba — sehr wahrscheinlich auf *adsorptive Eigenschaften* derselben zurückzuführen. Von der Tierkohle wenigstens wird der Farbstoff Trypanblau schon in vitro so stark adsorbiert, daß die Farbstofflösung mit Zugabe von Tierkohle ihre tinktoriellen Eigenschaften ganz verliert und, einmal in die Bauchhöhle eingeführt, im Blute gar nicht nachzuweisen ist. Bei der Obduktion der Versuchstiere findet man in solchen Fällen nur aus Tierkohle bestehende Niederschläge und ungefärbtes Peritoneum. Auch Bolus alba wirkt am stärksten, falls diese Substanz im Gemisch mit der Farbstofflösung eingeführt wird[1]).

Der Mechanismus der resorptionsverzögernden Wirkung anderer von mir gebrauchten Substanzen kann etwas komplizierter sein.

Kaum handelt es sich dabei nur um eine „Speicherung“ der Histiocyten des Netzes und Bauchfells mit eingeführten Kolloidlösungen, etwa im Sinne von *Pfeiffer* und *Staudenath*[2]). Vielmehr muß man bei der Erklärung der resorptionsverzögernden Wirkung von Gelatine, Gummi arabicum und Casein zu anderen Vorstellungen greifen. Es

---

[1]) Nach *Wiechowski* (Therap. d. Gegenw. **63**, 121, 1922) soll Bolus alba vorzugsweise *positiv* geladene Kolloide adsorbieren. Die Adsorption von Trypanblau durch diese Substanz könnte vielleicht darin eine Erklärung finden, daß dieser Farbstoff nach meiner Beobachtung unter gewissen Bedingungen auch *amphotere* Eigenschaften zeigen kann (diese Zeitschr. **161**, 1, 1925).

[2]) *Pfeiffer* und *Staudenath*, l. c.

konnte nämlich *Liesegang*[1]) nachweisen, daß die Diffusion von kristallinischen Stoffen ($AgNO_3$ und $NaCl$) in feste Gelatine in Anwesenheit von Gummi arabicum sich langsamer vollzieht als ohne diese Substanz. Ich konnte in speziellen, mit der Diffusion von Trypanblau in feste Gelatine angestellten Versuchen beobachten, daß die Diffusion des Farbstoffs aus wässerigen Lösungen schneller vor sich geht als aus 5proz. Gelatinelösung. So fand ich z. B. bei der Diffusion einer wässerigen Trypanblaulösung die Farbensäule nach 24 Stunden = 12 cm, bei Diffusion einer Trypanblau-Gelatinelösung = nur 8 cm lang. Im Versuch in vitro ist somit der Übergang des Farbstoffs Trypanblau in ein anderes Kolloid in Anwesenheit von Gelatine verlangsamt. Sehr möglich, daß wir es auch im Experiment in vivo (intraperitoneale Resorption von Trypanblau) mit ähnlicher Wirkung der Gelatine zu tun haben.

Welche physikalisch-chemischen Erscheinungen dabei die Hauptrolle spielen, ist schwer zu entscheiden. Zwei Erklärungen könnten in dieser Beziehung in Betracht kommen.

Erstens ist an *wasserentziehende Eigenschaften* der zu besprechenden Substanzen (Gelatine, Gummi arabicum, Casein) zu denken. *Fischer*[2]) hat nämlich gezeigt, daß infolge der Einführung wasserentziehender Substanzen die Resorption von Wasser aus der Bauchhöhle stark beeinträchtigt wird. Ja es kommt sogar zu einer Transsudation von Wasser in die Bauchhöhle. Da dadurch das Gleichgewicht in dem „Dreiphasensystem" gestört wird, kann es leicht zur Störung der Resorption auch der gelösten Substanz kommen.

Zweitens muß auch mit den *adsorptiven Eigenschaften* der zu besprechenden Substanzen gerechnet werden. So hat *Weyl*[3]) unlängst gezeigt, daß verschiedene Farbstoffe von Gelatine adsorbiert werden. Auch von Eiweißstoffen werden Farbstoffe adsorbiert, wie es aus den Untersuchungen der letzten Zeit resultiert [*Hirsch*[4]), *Rosenthal*[5]) u. a.].

Meine noch nicht beendigten Versuche zeigen, daß es sich bei der Adsorption von Trypanblau durch Kolloide vor allem um die Adsorption des *blauen* Farbenkomponenten handelt. Wenn nämlich in schwache (1:10000) Trypanblaulösung geschnittenes Filtrierpapier eingetaucht wird, so färben sich die Papierstückchen nach 24 Stunden schön himmelblau, während die Flüssigkeit einen deutlichen violettrosigen Farbenton bekommt. Ähnliches beobachtet man im Versuche mit der Adsorption durch $Al(OH)_3$: falls man durch Alkali einen Niederschlag dieser Substanz in schwacher

---

[1]) *Liesegang*, Die Diffusion in Gallerte. Abderhaldens biol. Arbeitsmeth. 1924.

[2]) *Fischer*, Kolloidchem. Beihefte 2, 304, 1911.

[3]) *Weyl*, l. c.

[4]) *Hirsch*, Journ. of biol. Chem. 63, 135, 1925.

[5]) *Rosenthal*, Journ. of pharm. a. exper. Therap. 25, 2, 1925; ref. Ber. d. ges. Phys. 32, 8, 1925.

(1 : 10000) Trypanblaulösung erzeugt, so färbt sich der letztere rein himmelblau, das Filtrat aber zeigt einen Stich ins Rosa. Diese Erscheinungen treten nur in sehr schwachen (etwa 1 : 10000) Farbstofflösungen auf. Es liegt der Gedanke nahe, daß der Farbenumschlag von Trypanblau ins Blaue in Gegenwart von Kolloidlösungen [von mir[1]) und von *Seyderhelm* und *Lampe*[2]) beobachtete Erscheinung] durch *elektive Adsorption des blauen Komponenten* durch Kolloidteilchen verursacht wird. Wird nämlich in Trypanblaulösung mit Zusatz von Hühnereiweiß das Eiweiß durch Erwärmen zur Ausflockung gebracht, so verliert die Flüssigkeit ihre rein blaue Färbung und wird rosaviolett. Unterdessen verursacht der Zusatz von Gelatine zum isolierten roten Komponenten keinen Farbenumschlag ins Blaue.

Die von mir beobachtete resorptionsverzögernde Wirkung verschiedener adsorptionsfähiger Substanzen ist auch von einem anderen Punkte aus interessant. In der Therapie der Bauchfellentzündungen liegt es eben viel daran, die Resorption toxischer Substanzen aus der Bauchhöhle möglichst abzuschwächen. Die dazu zu gebrauchenden Mittel (Äther, Campheröl, Olivenöl und andere) sind zum Teil in bezug auf intraperitoneale Resorption kolloidaler Substanzen wirkungslos [siehe meine früheren Versuche[3])] und außerdem nicht immer für den Organismus indifferent. Adsorptiv wirkende Stoffe sind in dieser Beziehung harmloser; so ertrugen meine Versuchstiere wiederholte Injektionen von Tierkohle, Bolus alba, Gelatine und anderem ohne jegliche Schädigung ihres Zustandes, während z. B. Ätherinjektionen bei ihnen toxische Symptome nach sich riefen. Vor allem sind aber die untersuchten Substanzen viel wirksamer, wenigstens im Kaninchenversuch.

Alles Gesagte erlaubt den Schluß zu ziehen, daß Versuche auf dem Gebiet der „Adsorptionstherapie bei Peritonitis“ vollständig berechtigt erscheinen.

---

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. **201**, 579, 1923.

[2]) *Seyderhelm* und *Lampe*, Ergebn. d. inn. Med. und Kinderheilk. **27**, 245, 1925.

[3]) Diese Zeitschr. **151**, 1, 1925.

Die Zusammensetzung der Pektinstoffe der Zuckerrübe.

Von

Felix Ehrlich und Robert v. Sommerfeld.

(Aus dem Institut für Biochemie und landwirtschaftliche Technologie der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 3. Oktober 1925.)

Mit dem Namen „*Pektinstoffe*" bezeichnet man in der Pflanzenwelt weit verbreitete Substanzen kolloidaler Natur, die durch Wasser stark quellbar sind und sich durch schleimige, leimartige Lösungen und daraus herstellbare gallert- und geleeartige Niederschläge auszeichnen. Während nur relativ geringe Mengen davon in den Pflanzensäften gelöst vorkommen, finden sich die Pektinstoffe besonders stark angereichert in fleischigen Wurzeln und in Obstfrüchten, außerdem sind sie auch in fast allen frischen grünen, weniger dagegen in verholzten Pflanzenteilen anzutreffen. Das eigentliche „*Pektin*", auch Urpektin, Pektose oder Protopektin genannt, ist in kaltem Wasser unlöslich und bildet zusammen mit Cellulose, häufig auch mit Korksubstanz, Lignin, Saponin, Wachsarten und anderen Stütz- und Kittsubstanzen einen normalen integrierenden Bestandteil des Zellgerüstes der Pflanzen oder der Interzellularsubstanzen, in denen die Protoplasmazellen eingebettet sind. Außer für die Kenntnis der Zusammensetzung des Pflanzengewebes und der Vorgänge beim Wachstum der Pflanzen spielt diese interessante Körperklasse eine wichtige Rolle in der Technik vieler Industrien und Gewerbe, die landwirtschaftliche Rohstoffe verarbeiten, wie in der Industrie des Zuckers, der Obstkonserven (Marmeladen, Gelees), der Pflanzenleime, ferner bei der Aufbereitung und Röste von Flachs, Hanf, Tabak und bei der Gewinnung von vielen anderen Erzeugnissen.

In chemischer Hinsicht sind die Pektinstoffe als eine Gruppe von *hochmolekularen Kohlenhydraten* aufzufassen, die den Pentosanen und Hemicellulosen nahestehen, von diesen aber durch den eigenartigen Gehalt bestimmter *Säurekomplexe* scharf unterschieden sind.

Seitdem *Braconnot*[1]) zuerst im Jahre 1825 eine gallertbildende Substanz aus Fruchtsäften abschied, die er als *Pektin* bezeichnete, sind im Laufe von nunmehr 100 Jahren über die Chemie der Pektinstoffe eine große Anzahl ausgedehnter Untersuchungen[2]) ausgeführt worden, die sich vor allem an die Namen von *Fremy*, *Scheibler*, *A. Herzfeld*, *Wohl* und *v. Niessen*, *v. Lippmann*, *Tollens* und *v. Fellenberg* knüpfen. Aus diesen früheren Arbeiten war bekannt geworden, daß das Pektin der Pflanzen durch heißes Wasser löslich zu machen ist und aus den wässerigen Lösungen durch Alkohol, Bleiessig usw. gefällt werden kann. Durch Behandlung mit Säuren und Alkalien erfährt es einen hydrolytischen Abbau zu eigenartigen, zum Teil ebenfalls noch kolloidalen Spaltprodukten, von denen in der Literatur eine große Anzahl beschrieben sind, wie das Parapektin, das Metapektin, die Parapektinsäure, die Metapektinsäure oder Arabinsäure. Alle diese amorphen Substanzen sind aber nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse wohl kaum als chemische Individuen, sondern als Gemische differenter Körper anzusehen. Auf Grund der früheren Untersuchungen betrachtete man die Pektinstoffe als Anhydride oder lactonartige Gebilde gewisser Kohlenhydrate, zu denen man die *Arabinose*, *Galaktose* und *Methylpentosen* rechnete, und bestimmter *Schleimsäure*bildender Komplexe und *Carboxyl*gruppen. Von diesen Kohlenhydraten war aber aus Pektin allein die *Arabinose* in Substanz isoliert worden, die übrigen Zuckerarten dagegen nur durch den keineswegs eindeutigen positiven Ausfall von Farbreaktionen und durch die Bildung von Schleimsäure bei der Oxydation wahrscheinlich gemacht.

Von neueren Arbeiten über die Pektinstoffe sind die von *v. Fellenberg*[3]) besonders bemerkenswert. Ihm gelang zuerst der sehr wichtige Nachweis des *Methylalkohols*, der durch Alkalien, Säuren und auch durch gewisse Enzyme aus den Pektinstoffen abspaltbar ist und darin in Mengen bis zu durchschnittlich 10 Proz. vorkommt. *v. Fellenberg* nahm an, daß „Pektin" nichts weiter ist als der leicht verseifbare Methylester einer von ihm „Pektinsäure" benannten hochmolekularen Kohlenhydratsäure, innerhalb deren er bereits eine Übergangsstufe zwischen Galaktose und Schleimsäure vermutete. Damit steht allerdings die von ihm ermittelte Zusammensetzung des Orangenpektins (36,1 Proz. Araban, 6,0 Proz. Methylpentosan, 49,3 Proz. Galaktan, 11,5 Proz. Methylalkohol, zusammen 102,7 Proz.) nicht recht in Einklang, denn ein solches Analysenresultat läßt keinen Raum für einen Gehalt des Pektins an Säure- oder Carboxylgruppen.

Die endgültige Aufklärung über die Säurenatur und über den allgemeinen Aufbau der Pektinstoffe erbrachten dann die im Jahre 1917

---

[1]) Ann. chim. phys. 28, 173; 30, 96, 1825.

[2]) Die sehr umfangreiche Literatur über die Chemie der Pektinstoffe vgl. bei *v. Lippmann*, Chemie der Zuckerarten; *Tollens*, Handb. d. Kohlenhydrate; *Czapek*, Biochem. d. Pflanzen; ferner bei *v. Fellenberg*, a. a. O.

[3]) Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, veröffentl. vom Schweizer Gesundheitsamt 5, 225, 1914; diese Zeitschr. 85, 45, 1918.

einsetzenden Untersuchungen *F. Ehrlichs*[1]), die zur Auffindung des Hauptbestandteils dieser wichtigen Pflanzenstoffe, der *d-Galakturonsäure*, führten. Diese dem Pektin eigentümliche, in der Natur früher nicht beobachtete Verbindung, die bis dahin nur als Reduktionsprodukt der Schleimsäure in Lösung unter dem Namen Aldehydschleimsäure bekannt war[2]), gelang es, aus den Hydrolysaten des Pektins zum erstenmal *in kristallisierter Form* abzuscheiden. Die d-Galakturonsäure verhält sich der d-Glykuronsäure[3]) sehr ähnlich. Sie gibt wie diese *alle Reaktionen der Pentosen* und auch die *Tollensche Naphthoresorcinreaktion*. Während d-Glykuronsäure durch Oxydation in d-Zuckersäure übergeht, wird *d-Galakturonsäure* durch heiße Salpetersäure, im Gegensatz zur Galaktose aber auch bereits durch *Brom in der Kälte in Schleimsäure* übergeführt. Die Konstitution der d-Galakturonsäure und die stereochemischen Beziehungen zu den ihr nahestehenden Kohlenhydratverbindungen ergeben sich aus dem folgenden Schema:

CHO		CHO		COOH
HCOH		HCOH		HCOH
HOCH		HOCH		HOCH
HCOH	→	HCOH	→	HCOH
HCOH		HCOH		HCOH
CH_2OH		COOH		COOH
d-Glykose		d-Glykuronsäure		d-Zuckersäure
CHO		CHO		COOH
HCOH		HCOH		HCOH
HOCH		HOCH		HOCH
HOCH	→	HOCH	→	HOCH
HCOH		HCOH		HCOH
CH_2OH		COOH		COOH
d-Galaktose		d-Galakturonsäure		Schleimsäure

Neben der Galakturonsäure wurde bei der Spaltung des Pektins auch zum erstenmal *d-Galaktose* in Substanz gewonnen und damit als normaler Bestandteil darin nachgewiesen.

Die Isolierung und Reindarstellung der Galakturonsäure war erst möglich, nachdem es zuvor durch eine besonders durchgeführte Hydrolyse

---

[1]) *F. Ehrlich*, Chem.-Ztg. **41**, 197, 1917; Ber. d. Faserstoff-Analysenkommission d. Ver. d. Zellstoff- u. Papier-Chemiker Berlin 1920, S. 88; Deutsche Zuckerindustrie **49**, 1046, 1924; Chem. Centralbl. **1924**, II, 2797; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **59**, 1926; *H. Gaertner*, Dissertation Techn. Hochschule Breslau 1919; Z. Ver. Deutsch. Zuckerind. **69**, 233, 1919.

[2]) *E. Fischer* und *Hertz*, Ber. **24**, 2136, 1891; **25**, 1247, 1892. — Die von *Suarez*, Chem.-Ztg. **41**, 87, 1917 in den Zitronen vermutete Aldehydschleimsäure erscheint analytisch nicht genügend charakterisiert.

[3]) *F. Ehrlich* und *K. Rehorst*, Ber. **58**, 1989, 1925.

gelungen war, den Säurekomplex von den übrigen Kohlenhydraten des Pektinmoleküls loszulösen. Durch Spaltung mit Alkali odernoch besser mittels verdünnter Salzsäure unter bestimmten Bedingungen wurde aus wasserlöslichem Pektin (Hydropektin) eine zuckerfreie, schwer lösliche Substanz von ausgesprochen saurem Charakter erhalten, die sich als ein *polymeres Anhydrid der d-Galakturonsäure* von der Formel $(C_6H_{10}O_7-H_2O)x$ erwies. Diese vorläufig *Polygalakturonsäure* genannte Verbindung, die *Fehling*sche Lösung nicht reduziert, zeichnet sich besonders durch ihr sehr hohes Drehungsvermögen $[\alpha]_D = +272$ bis $+285^0$ aus. Sie ist in Wasser schwer, in Salzsäure ganz unlöslich, liefert wasserlösliche Alkalisalze und gibt mit Metallsalzen dicke flockige Niederschläge. Besonders eigentümlich ist das Verhalten ihrer Erdalkalisalze, die sich in Form von wasserklaren steifen Gallerten abscheiden.

Eine Säure von ähnlichem Charakter wie die Polygalakturonsäure, aber anscheinend in weniger reiner Form, hat offenbar schon *v. Fellenberg* in Händen gehabt. Er erhielt sie bei der Alkalihydrolyse des Methylesters „Pektin" und betrachtete sie als ein vollkommen verseiftes „Pektin", das er mit dem Namen „Pektinsäure" bezeichnete. Nach Kenntnis der ersten Arbeiten *F. Ehrlichs* über die Galakturonsäure glaubte *v. Fellenberg*[1]) annehmen zu müssen, daß seine „Pektinsäure" eine sehr hochmolekulare Verbindung mit acht Carboxylgruppen darstellt, die er sich durch Zusammenschluß von 2 Mol. Arabinose, 1 Mol. Methylpentose, 1 Mol. Galaktose und 8 Mol. Galakturonsäure unter Austritt von 10 Mol. H_2O und Anfügung von 2 Mol. H_2O als Konstitutionswasser entstanden dachte. Er gab der „Pektinsäure" dementsprechend die komplizierte Bruttoformel $C_{70}H_{104}O_{68}$ oder $C_{62}H_{96}O_{52}(COOH)_8$.

Die weiteren Arbeiten *F. Ehrlichs*[2]), deren Resultate durch unsere folgenden Untersuchungen bestätigt werden, haben dann gezeigt, daß der Polygalakturonsäure und ebensowohl auch der „Pektinsäure" *v. Fellenbergs* eine wesentlich einfachere Konstitution zukommt.

Durch längeres Kochen mit verdünnten Säuren oder schneller unter Druck ließen sich aus der *Polygalakturonsäure*, ohne daß eine Zunahme der Gesamtacidität erfolgte, stark reduzierende Lösungen von schwacher Rechtsdrehung erhalten, die *nur Galakturonsäure* und nebenher *keine Spur von irgendwelchen Kohlenhydraten* enthielten. Durch Reinigung über das Bariumsalz war daraus zum erstenmal *kristallisierte d-Galakturonsäure* zu gewinnen. Elementaranalysen, Molekulargewichts- und Aciditätsbestimmungen gaben übereinstimmend das wichtige Resultat, daß die Polygalakturonsäure aus Pektin als *dimeres Anhydrid der d-Galakturonsäure* zu betrachten ist, das einem

---

[1]) Diese Zeitschr. 85, 45, 1918.

[2]) Die betreffenden Arbeiten erscheinen demnächst ausführlicher in den Ber. d Deutsch. Chem. Ges.

Zusammenschluß von 2 Molekülen d-Galakturonsäure unter Austritt von 2 Molekülen H_2O seine Entstehung verdankt, indem die Aldehydgruppen beider Moleküle mit Hydroxylgruppen wechselseitig in Bindung getreten sind, analog den ähnlichen Verhältnissen im Komplex der Biosen, während die *beiden Carboxylgruppen frei* auftreten. Die Verbindung wurde daher als *Digalakturonsäure* bezeichnet und ihr die Formel $C_{12}H_{16}O_{12}$ oder $C_{10}H_{14}O_8(COOH)_2$ zuerteilt, die mit ihrem ganzen chemischen Verhalten durchaus übereinstimmt, was auch durch Analyse von Salzen dieser zweibasischen Säure zu beweisen war. Es handelt sich hier offenbar um einen *ganz neuen*, bisher nicht bekannt gewordenen *Typus von Kohlenhydratverbindungen*, die als *carboxylierte Biosen oder Disaccharide* aufzufassen sind.

In den Mutterlaugen der mittels Salzsäure aus Hydropektin abzuscheidenden *Digalakturonsäure a* hat dann *F. Ehrlich* noch eine zweite Anhydridsäure der Galakturonsäure aufgefunden. Sie unterscheidet sich von der ersteren durch ihre leichte Löslichkeit in Wasser und in Salzsäure sowie durch ein etwas geringeres Drehungsvermögen $[\alpha]_D = +240^0$, zeigt aber im übrigen ähnliche Eigenschaften und die gleiche Bruttozusammensetzung einer zweibasischen Säure entsprechend der Formel $C_{12}H_{16}O_{12}$ oder $C_{10}H_{14}O_8(COOH)_2$. Es handelt sich hier offenbar um eine der obigen Säure isomere Verbindung, die als *Digalakturonsäure b* bezeichnet wurde und aus der ebenfalls durch Säurehydrolyse *kristallisierte d-Galakturonsäure* zu gewinnen war.

Die früher in der Pektinsäure vermutete[1]) Galaktose-Galakturonsäure von der aus vereinzelten Analysenergebnissen angenommenen Formel $C_6H_{12}O_6 + C_6H_{10}O_7 - H_2O = C_{12}H_{20}O_{12}$ scheint dagegen nicht zu existieren. Eingehende Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich hierbei offenbar um zufällige Gemische von Digalakturonsäure b mit Galaktanresten aus nicht vollständig zersetzter Pektinsäure gehandelt hat.

Durch die weiteren Ergebnisse der Arbeiten *F. Ehrlichs* hat dann auch der *Begriff der „Pektinstoffe“* an und für sich wesentliche Wandlung erfahren. Nach dem Vorbild früherer Forscher, besonders von *Tollens sowie Bourquelot*[2]) und *Hérissey*, betrachtete man bis dahin allgemein als „Pektin“ die in Form flockiger Niederschläge erhaltene Substanz, die man gewinnt, wenn man aus Pflanzenteilen zunächst alle alkohollöslichen Bestandteile mit Alkohol extrahiert, den Pflanzenrückstand mit Wasser unter Druck erhitzt und die resultierende Lösung mit überschüssigem Alkohol unter Zusatz von Salzsäure fällt. Bei allen diesen Verfahren war übersehen worden, daß in dem Alkoholfiltrat

[1]) *F. Ehrlich, H. Gaertner*, a. a. O.
[2]) Journ. Pharm. Chim. 7, 473; Chem. Centralbl. 1898, II, 20.

in merkbaren Mengen eine alkohollösliche Verbindung, ein Anhydrid der Arabinose, *Araban* genannt, verloren geht, das offenbar einen wesentlichen Bestandteil des ursprünglichen wasserunlöslichen Pflanzenpektins bildet. *F. Ehrlich* behält den Namen *Pektin* für die in kaltem Wasser unlösliche Ursprungssubstanz in den Pflanzen bei. Nach seiner Auffassung muß man annehmen, daß dieses *Pektin* durch kochendes Wasser, besonders schnell unter Druck, in der Weise in Lösung geht, daß es hydrolytisch unter Wasseraufnahme in zwei schon in kaltem Wasser lösliche, von einander sehr verschiedenartige Verbindungen zerlegt wird, deren Gemisch er als *Hydropektin* bezeichnet. Man gewinnt dieses wasserlösliche Hydropektin in Form von gelblichen bis bräunlichen gelatineartigen Blättern, die ein reversibles Kolloid bilden, wie zuerst am Beispiel der Rübe gezeigt wurde, sehr einfach dadurch, daß man die wässerigen Pektinextrakte direkt zur Trockne verdampft. Das Hydropektin aus Zuckerrüben erwies sich als ein Gemenge von linksdrehendem *Araban* und einem rechtsdrehenden *Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure*, einer Estersäure. Durch Extraktion mit 70proz. Alkohol, in dem das Araban schon in der Kälte leicht löslich ist, ließen sich beide Verbindungen glatt voneinander trennen. In dem ursprünglichen *Pektin* der Zuckerrübe sind dagegen offenbar *Araban* und *Calcium-Magnesiumpektinat* miteinander vereinigt in Form einer Verbindung vorhanden, die durch heißes Wasser bereits in die beiden Komponenten gesprengt wird. Das geht auch schon daraus hervor, daß direkt aus dem Rübenmark mit verdünntem Alkohol *Araban nicht* extrahierbar ist.

Aus dem Salz der Pektinsäure gewinnt man durch Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol und Salzsäure die *Pektinsäure* selbst in Form einer dicken farblosen Gallerte, die bei weiterer Reinigung und beim Behandeln mit Alkohol und Äther schließlich zu einem farblosen lockeren Pulver von minimalem Aschegehalt zusammentrocknet. Die *Pektinsäure*, die schwachen, aber deutlichen Säurecharakter besitzt, löst sich leicht in Wasser und zeigt eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D = +130$ bis $+230^0$. Sie ist aus wässeriger Lösung mit Alkohol, aber auch mit Bleiessig und vielen Metallsalzen fällbar und scheinbar identisch mit der Substanz, die man bis dahin als „Pektin" bezeichnet hat (*v. Fellenberg*). Es erscheint aber im Zusammenhang mit dem, was oben über das Pektin gesagt wurde, zweckmäßiger, diese Verbindung *Pektinsäure* zu benennen, da sie dem ursprünglichen Pektin, von dem sie ein Spaltprodukt ist, chemisch noch sehr nahe steht, aber eine deutlich titrierbare Säure ist. Wie im folgenden des Näheren gezeigt wird, enthält die *Pektinsäure* an Bestandteilen außer dem esterartig gebundenen *Methylalkohol* und dem beträchtlichen Komplex der *Galakturonsäure* noch die beiden Kohlenhydrate *d-Galaktose* und

l-Arabinose und schließlich die *Essigsäure*, die hier als regelmäßiger Baustein der Pektinstoffe neu aufgefunden wurde. Es ergibt sich folgerichtig, wie bereits oben erwähnt ist, daß die aus der *Pektinsäure* durch Säure- oder Alkalihydrolyse herausgesprengte zuckerfreie Anhydro-Galakturonsäure besser mit ihrem aus der Konstitution folgenden chemischen Namen *Digalakturonsäure* bezeichnet wird.

Die nachstehenden Untersuchungen bringen eine weitere Ergänzung und Bestätigung der früheren Befunde *F. Ehrlichs* und liefern neues Material zur Frage der Chemie der Pektinstoffe. Sie beschäftigen sich in erster Linie mit der Aufarbeitung des *Arabans* und der *Pektinsäure* sowie ihrer *Spaltprodukte*, und geben zum ersten Mal am Beispiel der *Zuckerrübe* einen annähernd vollständigen Überblick über die *qualitative* und *quantitative Zusammensetzung der Pektinstoffe einer Pflanze.*

Als Ausgangsmaterial für die folgenden Untersuchungen dienten anfangs frische Zuckerrüben, später allgemein Rübentrockenschnitzel aus Zuckerfabriken in der Art, wie sie in der Landwirtschaft als wertvolles Futtermittel benutzt werden. Die frischen Rüben wurden zu feinem Brei zerrieben und aus diesem durch Ausziehen mit kaltem Wasser, Alkohol und Äther und Trocknen an der Luft möglichst zuckerfreies Rübenmark hergestellt. Die Trockenschnitzel waren im Betriebe der Zuckerfabriken entzuckert und mittels Feuergasen getrocknet.

Zur möglichst zweckmäßigen Gewinnung von Pektin aus Rüben wurde zunächst eine große Zahl von Auslaugeversuchen mit Wasser von verschiedenen Temperaturen angestellt und die dabei erhaltenen Extrakte auf Drehung, Löslichkeit usw. untersucht. Das Rübenmark und die Trockenschnitzel enthalten stets noch deutliche Mengen von Zucker und Saftbestandteilen, die am besten durch mehrmaliges Ausziehen *mit Wasser von 55 bis 60⁰* zu entfernen sind, wobei das Pektin *noch nicht* in Lösung geht. Gegenüber der Methode von *Bourquelot* und *Hérissey* kann man durch dieses Verfahren beträchtliche Mengen Alkohol ersparen. Wenn man dann die Temperatur des Wassers auf 80⁰ steigert, wird Pektin bereits merkbar löslich gemacht und in Hydropektin übergeführt. Kochendes Wasser von 100⁰ beschleunigt diesen Prozeß sehr wesentlich. Durch *fünf- bis sechsmaliges mehrstündiges Auskochen mit der 15- bis 20fachen Menge Wasser* wird aus entzuckertem Rübenmark oder Rübenschnitzeln *die Hauptmenge Hydropektin in Mengen bis zu 25 bis 30 Proz. der lufttrocknen Rübensubstanz* gewonnen. Doch bedarf es zur vollständigen Erschöpfung einer noch viel länger fortgeführten Auskochung mit häufig erneuertem Wasser. Durch Kochen mit Wasser unter Druck auf 1 bis 2 Atm. kann man die Löslichmachung des Pektins noch wesentlich stärker beschleunigen und

wirksamer machen[1]). Hierbei werden aber infolge partieller Zersetzung bereits ziemlich dunkelbraun gefärbte Extrakte und entsprechend denaturierte Präparate erhalten. Unter Zuhilfenahme des Überdrucks läßt sich *mit heißem Wasser* etwa *die Hälfte der Trockensubstanz des Rübenmarks* aus Rüben oder Trockenschnitzeln *in Lösung* bringen.

Durch Verdampfen der auf diese Weise erhaltenen wässerigen Auszüge gewinnt man das *Hydropektin* in Form einer gelb- bis dunkelbräunlichen blättrigen Masse. Mit 70proz. Alkohol schon in der Kälte, schneller beim Erwärmen, läßt sich aus dem Hydropektin das *Araban* auslaugen, während das *Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure* ungelöst zurückbleibt. Es ließ sich von neuem bestätigen, daß unter diesen selben Bedingungen *aus der ursprünglichen Rübensubstanz* des Markes und der Schnitzel mit Alkohol *Araban nicht zu extrahieren* ist, auch wenn noch so lange mit Alkohol gekocht wird. Es kann sich also bei dem Araban nicht etwa um ein Pentosan handeln, das zufällig neben dem Pektin in der Rübenwurzel vorhanden war. Auch sind alkohollösliche Pentosane bisher nicht bekannt geworden. Vielmehr ist in Bestätigung früherer Ergebnisse, die auch bei Pektinstoffen anderer Pflanzen erhalten wurden, anzunehmen, daß *in dem ursprünglichen Pektin*, das sich wasserunlöslich im Zellgerüst der Rübenwurzel befindet, *Araban mit dem pektinsauren Salz vereinigt in einer lockeren*, bereits durch heißes Wasser sprengbaren *Bindung* vorliegt. Ein weiterer wichtiger Beweis für diese Anschauung ergibt sich daraus, daß im Hydropektin *die beiden Komponenten* immer *annähernd in denselben Mengenverhältnissen* vorhanden sind. Bei verschieden durchgeführten Auslaugungen wurden regelmäßig im *Hydropektin* etwa *25 bis 35 Proz. Araban* und *65 bis 75 Proz. Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure* gefunden.

Araban. Die alkoholischen Auslaugungen des Hydropektins ergeben im Vakuum zur Trockne verdampft, einen bräunlichen, etwas hygroskopischen Rückstand, das *Roharaban*. Dieser Körper besitzt ein spezifisches Drehungsvermögen von durchschnittlich $[\alpha]_D = -105^{\circ}$, reagiert gegen Lackmus sauer und ist aschehaltig. *Fehling*sche Lösung wird deutlich, wenn auch schwach, reduziert. Daß es sich bei dieser Substanz tatsächlich um Anhydride der Arabinose handelt, zeigt die Furfuroldestillation mittels Salzsäure nach *Tollens*, die einen Gehalt von ungefähr 90 Proz. Pentose angibt. Schon durch kurzes Kochen mit verdünnter Schwefelsäure wird das Araban vollkommen hydrolysiert, und es läßt sich *kristallisierte l-Arabinose* bis zu *90 Proz.* des angewandten *Roharabans* gewinnen.

---

[1]) Dieses Verfahren kann zur Gewinnung von Klebstoffen aus Rübenschnitzel dienen. *F. Ehrlich-Kutzner*, D. R.-P. Nr. 384772 (11. April 1917).

Als verunreinigender Bestandteil sind in dem Roharaban noch geringe Mengen Pektinsäure und Saponinsubstanzen enthalten, deren Übergang in die alkoholischen Extrakte des Hydropektins sich nicht vermeiden läßt. Außerdem sind dem Roharaban Salze der Essigsäure beigemengt. Wie weiter unten beschrieben wird, gelang es, im Laufe der Arbeiten einen neuen Bestandteil der Pektinsäure, die *Essigsäure*, aufzufinden. Diese wird nun schon in geringem Maße bei dem Auslaugen des Pektins aus dem Rübenmaterial durch die hydrolysierende Einwirkung des Wasser abgespalten und geht als alkohollösliches Salz bei dem Auslaugen des Hydropektins mit 70proz. Alkohol mit in die alkoholische Arabanlösung.

Das Roharaban wurde zur Befreiung von den oben genannten Beimengungen mit Alkohol verschiedener Konzentrationen fraktioniert ausgekocht.

Hierbei lassen sich Substanzen erzielen, die nicht so sauer reagieren und ebenfalls nicht in dem Maße reduzieren wie das Roharaban. Es sind gelb bis braun gefärbte, amorphe Körper, die zum Teil hygroskopisch sind.

Entsprechend der größeren Reinheit erhöhte sich auch das spezifische Drehungsvermögen dieser Präparate von $[\alpha]_D = -60^0$ aufsteigend bis zu $[\alpha]_D = -173^0$. Ebenso zeigte die Furfurolsalzsäuredestillation einen höheren Pentosengehalt, nämlich bis zu *93 Proz. des Arabans*, an.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß es sich bei dem Araban um ein Gemisch von verschiedenen Anhydriden der Arabinose handelt. Verbrennungsanalysen einzelner Arabane liefern Werte, die ungefähr einer Zusammensetzung $2\,C_5H_{10}O_5 - H_2O$ und $3\,C_5H_{10}O_5 - 2\,H_2O$ entsprechen. Molekulargewichtsbestimmungen durch Gefrierpunktserniedrigung ergaben mit der Molekulargröße dieser Formeln annähernde Übereinstimmung.

Außer diesen Körpern ließ sich aber noch ein Araban isolieren, das analog dem zuerst von *F. Ehrlich* aus Rübenmark erhaltenen Araban eine Zusammensetzung von $(C_5H_{10}O_5 - H_2O)x$ zeigte, also vielleicht einer Molekulargröße von $2\,C_5H_{10}O_5 - 2\,H_2O$ entspricht. Dieses Araban wies allerdings eine ganz besonders hohe, bisher nicht beobachtete spezifische Drehung von $[\alpha]_D = -173^0$ auf, während *F. Ehrlich* bei seinem Präparat eine Drehung von nur $-76{,}9^0$ gefunden hatte. Es scheint, daß auch hier wieder Unterschiede in der Molekülgröße Ursache der beobachteten Differenz sind.

Offenbar wirkt die hohe Heiztemperatur bei der Trocknung der Rübenschnitzel im Fabrikbetrieb im Verein mit dem verdampfenden Wasser schon hydrolysierend auf die Pektinsubstanz, insbesondere auf die Arabankomponente ein, so daß in den Fabriktrockenschnitzeln

schon partiell gespaltenes Araban vorliegt. Daher erklärt sich wohl, daß Gemische verschiedener, so stark in ihrer Zusammensetzung, Drehung und Reduktionsfähigkeit abweichender Arabane in dem Roharaban aus Schnitzeln enthalten sind.

Da die durch fraktioniertes Auskochen oder Ausfällen mit Alkohol erhaltenen Arabanpräparate immer noch schwach sauer reagieren und ein geringes Reduktionsvermögen zeigen, wurde auch der Weg eingeschlagen, das Roharaban in wässeriger Lösung mit Calcium-, Barium- oder Bleicarbonat oder auch mit Kalk- oder Barytwasser zu behandeln, in der Hoffnung, die entsprechenden Salze der verunreinigenden Säuren besser abtrennen zu können. Aber auch dieser Weg brachte keine weiteren Erfolge, da die Löslichkeitsverhältnisse zu wenig verschieden waren.

Ullik[1]) gibt an, aus dem Rübenmark durch Behandeln mit Kalk auf sehr umständlichem Wege ein nicht in Alkohol lösliches Araban in Form eines weißen, amorphen Körpers von neutralem Charakter und ohne Reduktionsvermögen erhalten zu haben. Ein derartiges Araban konnte jedoch aus dem Hydropektin nicht gewonnen werden.

In dem Araban war außer dem Arabinosebestandteil kein anderes Kohlenhydrat aufzufinden.

Da dem Araban chemisch verwandte Körper, wie Gummi arabicum oder Tragantgummi bei der Hydrolyse teilweise außer Arabinose noch Galaktose liefern, lag es nahe, auch in dem Araban Galaktose zu vermuten.

Auch *v. Lippmann*[2]) berichtet von einer gummiartigen Ausschwitzung an Zuckerrüben, die bei der Hydrolyse mit verdünnten Säuren Arabinose und Galaktose liefert, und die er deswegen als Galakto-Araban auffaßt.

Bei den vorliegenden Arbeiten ist aber Galaktose in dem hydrolysierten Araban nicht gefunden worden, weder durch die Schleimsäurereaktion noch durch die Gärung. Auch die Umsetzung mit Hydrazinen lieferte nur Arabinosederivate, nicht aber solche der Galaktose.

Die vollkommene Hydrolyse des Arabans gelingt leicht durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure. Man gelangt hierbei zu *reiner kristallisierter l-Arabinose* in Mengen bis zu *90 Proz. des angewandten Arabans.*

Außer durch die Verbrennungsanalyse und die spezifische Drehung wurde die Arabinose auch durch Hydrazone, wie das *Diphenyl-* und *Benzylphenylhydrazon,* näher charakterisiert. Durch den Schmelzpunkt, die spezifische Drehung und die Stickstoffbestimmung wurden diese als Arabinosederivate erkannt.

---

[1]) Österreichisch-Ungarische Zeitschr. f. Zuckerindustrie **23**, 268; vgl. *v. Lippmann*, Kohlenhydrate, 3. Aufl., S. 58.
[2]) Ber. **23**, 3564, 1890.

Die *totale Aufspaltung* zur *Pentose* scheint bei dem *Araban* aus *Pektin wesentlich leichter und schneller* zu erfolgen wie bei anderen, früher beschriebenen Pentosanen aus Pflanzen, sie gelingt auch schon beim Kochen mit verdünnten organischen Säuren, z. B. 1 proz. Oxalsäure.

Tollens[1]) berichtet von einer durch Hydrolyse der Rübenschnitzel gewonnenen Arabonsäure. Diese war jedoch aus Hydropektin nicht zu erhalten.

Da sich in der Pektinsäure, wie später gezeigt wird, Essigsäure nachweisen ließ, wurde auch das Araban auf diese Säure untersucht. Bei der Wasserdampfdestillation der angesäuerten Arabanlösung konnten aber nur geringe Mengen von Essigsäure festgestellt werden. Offenbar ist diese Essigsäure durch die hydrolytische Einwirkung des Wassers bei der Auslaugung des Pektins aus dem Rübenmaterial teilweise aus der Pektinsäure abgespalten worden und bei der Auslaugung des Hydropektins mit in die alkoholische Lösung und somit in das Araban gelangt.

Im Zusammenhang hiermit wurden Körper, die dem Araban chemisch nahe stehen, ebenfalls auf Essigsäure untersucht. Bei *Gummi arabicum* fiel die Untersuchung negativ aus, während im *Tragantgummi* geringe Mengen, etwa *2,3 Proz. Essigsäure*, nachgewiesen werden konnten.

Um das Araban näher zu charakterisieren, wurde auch versucht, Benzoylderivate desselben herzustellen. Man gelangt hierbei jedoch nur zu Produkten sirupöser oder gummiartiger Beschaffenheit.

Die Acetylierung liefert feste, gelbbraune amorphe Körper, die indes nicht näher untersucht wurden. Ihr Acetylgehalt scheint darauf hinzudeuten, daß Produkte vorliegen, die pro Mol Arabinose 2 Mol Essigsäure gebunden enthalten, entsprechend der Formel eines Diacetyl-mono-anhydro-Arabans $[(C_5H_8O_5-H_2O) \cdot (CH_3CO)_2]x$.

Offenbar ist das Araban ursprünglich ein neutraler und nicht oder nur schwach reduzierender Körper, der lediglich aus Anhydriden der l-Arabinose besteht und gebundene Säurekomplexe, wie sie später in der nachher beschriebenen Pektinsäure gefunden wurden, nicht aufweist. Daß das extrahierte Araban zumeist mehr oder minder schwach saure Reaktion zeigt, erklärt sich einmal durch Verunreinigungen mit Essigsäure, die schon bei Behandlung des Rübenmarks mit heißem Wasser, in stärkerem Maße bei der Trocknung der Rübenschnitzel mit Feuergasen durch hydrolytische Einwirkung aus der zweiten Komponente des Hydropektins, dem Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure, abgespalten werden kann. Andererseits können auch geringe Mengen von Pektinsäure, die in den alkoholischen Arabanextrakt mit übergegangen sind, die scheinbare Acidität bedingen.

[1]) Ber. 36, 3321, 1903; 48, 1649, 1911.

Daß aus Trockenschnitzeln im allgemeinen Präparate des Arabans von größerer Reduktionskraft erhalten wurden als bei dem Araban aus schonend behandeltem Rübenmark, erklärt sich ebenfalls daher, daß bei den höheren Temperaturen des Trocknens die hydrolytische Wirkung des Wassers und der Essigsäure zu weiterer Aufspaltung des Arabanmoleküls geführt hat.

Im allgemeinen wird man das Araban als ein Gemisch verschiedener Arabinoseanhydride zu betrachten haben, dessen Zusammensetzung je nach der Vorbehandlung des Pflanzenmaterials und vielleicht auch je nach dem Alter und physiologischen Zustand der Rübenwurzel gewissen Schwankungen unterliegen kann.

Jedenfalls scheint aus den Untersuchungen mit Sicherheit hervorzugehen, daß die ***Metapektinsäure Fremys*** und auch die ***Arabinsäure Scheiblers***, die später auch von anderen Forschern angenommen wurden, tatsächlich ***nicht*** existieren, sondern als Gemische des in den vorliegenden Untersuchungen isolierten ***Arabans*** mit ***Essigsäure*** und ***Resten von Pektinsäure*** anzusehen sind.

Pektinsäure. Die andere Komponente des Hydropektins, der in 70proz. Alkohol unlösliche Anteil, ist eine rechtsdrehende Verbindung, die als das Calcium-Magnesiumsalz einer Säure, der Pektinsäure, aufzufassen ist.

Anfangs eine graubraune, blätterige Masse, kann das Calcium-Magnesiumsalz durch wiederholtes Lösen in Wasser und Ausfällen mit Alkohol als eine rein weiße Substanz erhalten werden. Beim Lösen in Wasser quillt das Salz erst gallertartig auf und geht dann vollkommen in Lösung. Das aus Rübenschnitzeln hergestellte Calcium-Magnesiumsalz ist praktisch neutral und besitzt ein spezifisches Drehungsvermögen[1]) von durchschnittlich $[\alpha]_D = +130^0$.

Das aus Rübenschnitzeln hergestellte pektinsaure Salz enthielt durchschnittlich 5,7 Proz. Carbonatasche.

Daß es sich hierbei nur um ein Calcium-Magnesiumsalz handelt, beweist die Aschenanalyse, die etwa 60 Proz. Calcium und 40 Proz. Magnesium neben geringen Mengen von Kieselsäure, Aluminium und Eisen ergibt.

Der Methoxylgehalt des Salzes, nach der Methode von *Zeisel-Fanto-Stritar* bestimmt, beträgt ungefähr 6,3 Proz. CH_3O.

Die *freie Pektinsäure* ist aus der wässerigen Lösung des Salzes leicht durch Ansäuern mit Salzsäure und Ausfällen mit Alkohol zu erhalten. Die Pektinsäure fällt in farblosen bis gelblichen gallertartigen Flocken aus und kann durch nochmaliges Umfällen mit Alkohol

[1]) Ein nebenher aus Feigenpektin nach analogem Verfahren hergestelltes Ca-Mg-Salz der Pektinsäure zeigte $[\alpha]_D = +140^0$.

und darauf folgende Behandlung mit Alkohol und Äther als ein schneeweißes Pulver mit einem minimalen Aschengehalt von ungefähr 0,4 Proz. gewonnen werden. Die Säure besitzt ein spezifisches Drehungsvermögen, das bei verschiedenen Präparaten von etwa $[\alpha]_D = +113^0$ bis $+164^0$ schwankte. Die Drehung kann sich aber auch erhöhen bis auf $[\alpha]_D = +220^0$ und mehr, wenn bei der Darstellung der Säure aus dem Calcium-Magnesiumsalz konzentriertere Salzsäure längere Zeit darauf eingewirkt hat, was zu weitergehender Spaltung führt.

Der Methoxylgehalt der Pektinsäure, nach der Methode von *Zeisel-Fanto* bestimmt, wurde zu 6,5 bis 6,9 Proz. CH_3O gefunden. Die Abspaltung des Methylalkohols erfolgt schon durch schwache Alkalien in der Kälte. *v. Fellenberg* und *F. Ehrlich* geben den Methoxylgehalt in der Pektinsäure zu 9 Proz. an, während bei den vorliegenden Arbeiten im Maximum nur 6,9 Proz. Methoxyl gefunden wurden. Diese Differenz scheint an der Verschiedenheit des Ausgangsmaterials zu liegen. *F. Ehrlich* benutzte Rübenmark oder frische Rübenschnitzel, die noch nicht höheren Temperaturen ausgesetzt waren, während bei den vorliegenden Untersuchungen ausgelaugte Schnitzel verwendet wurden, die in der Trocknungsanlage der Zuckerfabrik durch Feuergase getrocknet waren. Diese hohe Temperatur, die vermutlich auch die Arabankomponente angegriffen hat, scheint ebenfalls die Pektinsäure teilweise verändert zu haben, indem eine partielle Methoxylabspaltung stattgefunden hat.

Die Abspaltung des Methylalkohols aus der Pektinsäure kann auch, wie *v. Fellenberg* gezeigt hat, auf biochemischem Wege erfolgen. Durch Vergärung von pektinhaltigen Fruchtsäften konnte er den Methylalkohol in freier Form nachweisen, während das Pektin in methoxylarme oder methoxylfreie Abbauprodukte verwandelt wurde.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde ein Versuch angestellt, um die Einwirkung von Brennereihefe auf Hydropektin aus Rübenschnitzeln zu beobachten. Die aus diesem Gärungsversuch gewonnene Pektinsäure hatte aber alle Eigenschaften und Konstanten der vorhin beschriebenen Pektinsäure und ebenfalls denselben Methoxylgehalt. Die Brennereihefe scheint demnach auf Pektin nicht hydrolysierend zu wirken.

Die *Pektinsäure* löst sich in Wasser erst nach gallertartigem Aufquellen und kann ihrem Säurecharakter entsprechend mit Alkalien gegen Lackmus oder Phenolphthalein als Indikator titriert werden. Daß es sich hier um eine verhältnismäßig starke Pflanzensäure handelt, geht daraus hervor, daß 1 g Pektinsäure gegen Phenolphthalein durchschnittlich 15 ccm n/10 Natronlauge neutralisiert, und daß ihre Wasserstoffionenkonzentration zu $p_H = 3,8$ gefunden wurde.

Bemerkenswert ist der Befund von *Essigsäure* in der *Pektinsäure.*

In Pflanzenschleimen und anderen dem Pektin chemisch verwandten Körpern ist das Vorhandensein von gebundener Essigsäure bis jetzt nicht beobachtet worden. Man hat sie aber wohl im Lignin und gewissen Cellulosearten, vorzugsweise in der Cellulosesubstanz der Pilze[1]), dann aber auch im Grase und in Baumblättern nachgewiesen. Außerdem ist die Essigsäure in gebundener Form im Chitin und in der Chondroitinschwefelsäure der tierischen Knorpelsubstanz aufgefunden worden.

Es zeigte sich nun bei den nachstehenden Versuchen, daß die *Essigsäure als ein regelmäßiger wichtiger Bestandteil der Pektinstoffe* zu betrachten ist. Sie ist nicht mit dem Araban, sondern mit der Pektinsäure verbunden in Form von Acetylgruppen, die durch Säuren und Alkalien, teilweise aber schon durch heißes Wasser abspaltbar sind. Die abgespaltene Essigsäure kann mit Wasserdampf abdestilliert und titrimetrisch bestimmt werden. Es wurde im Durchschnitt *12,8 Proz. Essigsäure in der Pektinsäure* gefunden.

Nebenher entsteht bei der Spaltung der Pektinsäure mit Mineralsäuren Ameisensäure, die sich durch Zersetzung der Kohlenhydrate durch die Säureeinwirkung bildet.

Wahrscheinlich ist der Gehalt an Essigsäure in der Pektinsäure noch höher zu veranschlagen, da durch die hydrolytische Einwirkung des heißen Wassers beim Trocknen der Rübenschnitzel bereits ein kleiner Teil Essigsäure abgespalten ist, der sich dann, wie schon erwähnt, bei der Aufarbeitung des Arabans in freier Form oder in Salzen vorfindet[2]).

Neben dem Methylalkohol und der Essigsäure, die regelmäßige Bestandteile der Pektinsäure aus Rüben bilden und darin in nicht unbeträchtlichen Mengen vorkommen, mußte sich das größte Interesse nunmehr den Kohlenhydratsubstanzen zuwenden, die als Hauptbestandteil der Pektinsäure anzusehen sind. Die reine Pektinsäure gibt Reaktionen, die auf Pentosen, besonders Arabinose, und Hexosen, speziell Galaktose, hinweisen.

Sie gibt stark positive Orcin- und Naphthoresorcinreaktion, liefert bei der Salzsäuredestillation Furfurol und bei der Oxydation mit Salpetersäure Schleimsäure. Aus den bisherigen Untersuchungen von *F. Ehrlich* war zu folgern, daß neben der Galaktose den Hauptbestand-

[1]) *v. Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**, 521, 1894.

[2]) Als unsere Versuche bereits im wesentlichen abgeschlossen waren, erschien neuerdings eine Arbeit von *Smolenski*, referiert im Chem. Centralbl. **1924**, 2140, auf Grund deren in der Pektinsäure ein Gehalt von 11,5 Proz. Essigsäure angenommen wird. In dem betreffenden Referat ist allerdings nicht ersichtlich, wie der Autor die Essigsäure quantitativ bestimmte.

teil der Moleküls der Pektinsäure die *Galakturonsäure* beansprucht. Darauf deuten auch die erwähnten Reaktionen hin. Es war aber bisher nocht nichts über die quantitative Zusammensetzung in dieser Hinsicht bekannt.

Auch ließ sich nichts Sicheres über die Menge und Art der neben der Galakturonsäure im Pektinsäuremolekül vorhandenen Kohlenhydrate aussagen, besonders ob nur Galaktose und nicht etwa noch andere Zuckerarten, wie Methylpentosen[1]), vorhanden waren.

Die Galakturonsäure ist von *F. Ehrlich* in Form von Digalakturonsäure a und b und in Form der monomolekularen d-Galakturonsäure isoliert worden mit Hilfe besonders abgestufter Hydrolysen, die hauptsächlich direkt mit dem Hydropektin vorgenommen wurden. Es war dabei so verfahren worden, daß zunächst aus Hydropektin durch Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure Digalakturonsäure a und aus deren Filtrat mit Alkohol Digalakturonsäure b abgeschieden wurden, die dann nach weiterer Reinigung jede für sich bei Spaltung mit verdünnter Schwefelsäure unter hohem Druck die kristallisierte d-Galakturonsäure lieferten.

Es wurde nun zunächst versucht, diesen Körper aus der Pektinsäure selbst darzustellen und seine Ausbeute durch ein schonenderes Verfahren der Säurespaltung zu verbessern. Es zeigte sich, daß man tatsächlich dieselbe *d-Galakturonsäure* auch schon durch etwa 15stündiges Kochen mit 2proz. Schwefelsäure bei gewöhnlichem Druck gewinnen kann. Durch Neutralisation mit Bariumcarbonat erhält man dann das Bariumsalz, aus dem sich durch Zusatz der berechneten Menge Schwefelsäure die freie Säure herstellen läßt. Durch Auskochen der eingedampften Lösung mit Alkohol und Eindampfen der alkoholischen Flüssigkeit zum Sirup kann man zu kristallisierter Galakturonsäure gelangen.

Es wurde so in einem Falle aus 16 g Pektinsäure 1,1 g reine kristallisierte Galakturonsäure mit den früher beschriebenen Eigenschaften gewonnen. Die geringe Ausbeute an kristallisierter Substanz erklärt sich daraus, daß es sich auch bei diesem Verfahren ebenso wie bei allen anderen nicht vermeiden läßt, daß wesentliche Substanzmengen Zersetzung zu einem alkohollöslichen, bräunlich gefärbten, sirupartigen Körper erleiden, der *Fehling*sche Lösung schon in der Kälte stark reduziert und noch die Orcinreaktion gibt.

Das zunächst erhaltene Bariumsalz der Galakturonsäure zeigte eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D = +32{,}6^0$. Die daraus frei gemachte Galakturonsäure kristallisierte aus dem anfangs erhaltenen Sirup sehr bald in feinen, nadelförmigen Kriställchen vom Schmelzpunkt 159^0,

---

[1]) *v. Fellenberg*, a. a. O.

übereinstimmend mit der früher von *F. Ehrlich* isolierten Galakturonsäure. Wie diese zeigte sie auch, aus Alkohol umkristallisiert, Mutarotation mit einer Anfangsdrehung von $[\alpha]_D = +80^0$ bis zu einer Enddrehung $[\alpha]_D = +53{,}3^0$, während *F. Ehrlich* anfangs eine Mutarotation im umgekehrten Sinne gefunden hatte, von $[\alpha]_D = +30^0$ bis zu der Enddrehung $[\alpha]_D = +53{,}4^0$.

Die Mutarotationen der kristallisierten Substanz deuten darauf hin, daß ähnlich wie bei den einfachen Kohlenhydraten und wie im Falle der d-Glykuronsäure[1]) auch in der *d-Galakturonsäure Gemische eines α- und β-Stereoisomeren* vorliegen, deren Mengenverhältnis offenbar je nach der Darstellungsweise und je nach der Art des Umkristallisierens ein wechselndes sein kann.

Die Galakturonsäure zeigt in Wasser saure Reaktion. Aus der Titration mit Natronlauge gegen Phenolphthalein ist zu folgern, daß die kristallisierte Säure in freier Form auftritt, nicht als Lacton, im Gegensatz zur Glucuronsäure, aus deren Lösungen leicht das Lacton — Glucuron — kristallisiert.

1 g Galakturonsäure neutralisiert z. B. 52,1 ccm n/10 Natronlauge, während sich theoretisch 51,5 ccm n/10 Natronlauge dafür berechnen. Die Säure gibt schon bei der Oxydation mit Brom in der Kälte reichliche Mengen *Schleimsäure.*

Da das oben beschriebene präparative Verfahren mit großen Verlusten verknüpft war, wurde versucht, eine quantitative Bestimmung der Galakturonsäure in der Pektinsäure nach der *Tollens-Lefèvre*schen Methode[2]) auszuführen.

Diese Forscher haben gezeigt, daß Glucuron durch Erhitzen mit 12proz. Salzsäure in Furfurol und Kohlensäure gespalten wird. Aus der gefundenen Kohlensäuremenge berechnen sie zufolge der Gleichung:

$$\underset{\text{Glykuron}}{C_6H_8O_6} = \underset{\text{Furfurol}}{C_5H_4O_2} + 2\,H_2O + CO_2$$

die Menge des vorhandenen Glykurons.

Analoge Versuche im hiesigen Institut haben erwiesen, daß auch die Galakturonsäure quantitativ im Sinne der Gleichung:

$$\underset{\text{Galakturonsäure}}{C_6H_{10}O_7} = \underset{\text{Furfurol}}{C_5H_4O_2} + 3\,H_2O + CO_2$$

gespalten wird.

Eine quantitative Untersuchung nach diesem Verfahren ergab in der *Pektinsäure 64,8 Proz. d-Galakturonsäure,* die demnach den überwiegenden Teil des Pektinsäuremoleküls ausmacht.

---

[1]) *F. Ehrlich* und *K. Rehorst,* a. a. O.

[2]) Ber. 40, 4513, 1907.

Wendet man bei der Hydrolyse der Pektinsäure nicht so energische Mittel wie 15stündiges Kochen mit 2proz. Schwefelsäure an, sondern läßt 2proz. Salzsäure bei Wasserbadhitze mehrere Stunden auf Pektinsäure einwirken oder behandelt Pektinsäure einige Zeit in der Kälte mit Barytwasser, so wird diese nicht vollkommen bis zur monomolekularen Galakturonsäure aufgespalten. Es entstehen vielmehr ähnlich wie aus Hydropektin zwei *verschiedene Polygalakturonsäuren*, die in glykosidartiger Bindung mehrere Moleküle der freien Galakturonsäure enthalten. Zunächst scheidet sich in Mengen bis zu 40 Proz. der Pektinsäure, in Salzsäure unlöslich und in Wasser schwer löslich, eine *Digalakturonsäure a* ab, die mit der früher beschriebenen[1]), aus Hydropektin erhaltenen, in ihren Eigenschaften im wesentlichen übereinstimmt, bis auf einen Mehrgehalt von 1 Mol H_2O. Sie besitzt demnach die Formel *eines Hydrats der Digalakturonsäure a* $C_{12}H_{16}O_{12} . H_2O$ und zeigt, im Vakuum bei 100° getrocknet, eine spezifische Drehung in neutraler Lösung von $[\alpha]_D = +278^0$, während die aus Hydropektin bereitete Digalakturonsäure a $C_{12}H_{16}O_{12}$, im Vakuum bei 100° getrocknet, $[\alpha]_D = +285^0$, bei 110° an der Luft getrocknet, $[\alpha]_D = +272^0$ aufwies.

Aus dem Filtrat der zweibasischen a-Säure ließ sich durch Fällen mit Alkohol eine in Wasser und Salzsäure leicht lösliche, ebenfalls zweibasische *Digalakturonsäure b* von der gleichen Bruttoformel $C_{12}H_{16}O_{12}$ isolieren, die eine etwas niedrigere Drehung von $[\alpha]_D = +247^0$ zeigte, wie sie früher auch aus Hydropektin hergestellt war.

Daß es sich hier um dimolekulare Verbindungen mit zwei freien Carboxylgruppen handelte, ging aus der Analyse und der Molekulargewichtsbestimmung ihrer Natriumsalze hervor. Die neutralen Natriumsalze beider Säuren zeigen eigentümlicherweise dieselbe prozentische Zusammensetzung, die anscheinend der Formel $C_{12}H_{14}O_{12}Na_2 . H_2O$ entspricht. Doch handelt es sich tatsächlich um zwei verschiedene Verbindungen, was außer durch die Unterschiede im Drehungsvermögen aus dem Verhalten gegen Salzsäure zu beweisen ist. Versetzt man die wässerige Lösung des Natriumsalzes der a-Säure mit Salzsäure, so scheidet sich sofort die a-Säure selbst unlöslich ab, während die Lösung des Natriumsalzes der b-Säure unter diesen Bedingungen vollkommen klar bleibt. Man muß also annehmen, daß die Digalakturonsäuren a und b Isomere sind, in denen die beiden Moleküle Galakturonsäure sich in verschiedener Bindung miteinander verkettet vorfinden.

Ob die Digalakturonsäuren, die unter verschiedenen Bedingungen bei der Spaltung der Pektinsäure entstehen, tatsächlich als solche Bausteine des Pektinsäuremoleküls bilden und nicht etwa erst bei

---

[1]) *F. Ehrlich*, a. a. O.

der Hydrolyse aus größeren Molekülkomplexen abgesprengt oder teilweise durch Umlagerung unter dem Säureeinfluß erst entstanden sind, läßt sich auf Grund der bisherigen Untersuchungen noch nicht aussagen. Da die Molekulargröße der Pektinsäure und ihr Gehalt an Galakturonsäure mit großer Wahrscheinlichkeit darauf schließen läßt, daß 4 Moleküle Galakturonsäure sich in gegenseitiger Bindung im Pektinsäuremolekül befinden, so ist zu folgern, daß die abgespaltenen Digalakturonsäuren Bruchstücke dieses Galakturonkomplexes darstellen.

Wenn man auch annehmen muß, daß im Pektinsäuremolekül die Carboxyle der untereinander verbundenen Galakturonsäuremoleküle zum Teil mit Methylalkohol verestert vorliegen, so ist jedenfalls sicher, daß die daraus abgespaltenen Digalakturonsäuren nur als freie Säuren mit freien Carboxylgruppen, nicht aber als lactonartige Anhydride analog etwa dem Glykuron zu betrachten sind. Dies läßt sich ohne weiteres aus den Aciditätsbestimmungen der einzelnen Säuren und der Analyse ihrer Salze folgern.

Die Verbindung der beiden Moleküle innerhalb der Digalakturonsäure kann nur in analoger Weise wie im Molekül von Polysacchariden erfolgt sein, nämlich durch Wasseraustritt zwischen Aldehyd- und Hydroxylgruppen, wobei glykosidartige Bindungen mit entsprechenden Sauerstoffbrücken entstanden sind. Dem entspricht auch die Tatsache, daß die Disäuren und ihre löslichen Salze *Fehling*sche Lösung in sehr geringem Maße reduzieren, so daß also freie Aldehydgruppen darin nicht vorhanden sein können.

Neben der Galakturonsäure entstehen nun bei der vollkommenen Hydrolyse der Pektinsäure mit Säuren noch zwei Kohlenhydrate, nämlich die *l-Arabinose* und *d-Galaktose*. Durch Neutralisation mit Bariumcarbonat und Ausfällung des Bariumsalzes der Galakturonsäure mit Alkohol erhält man eine Lösung, die zum Sirup eingedampft, ein Gemisch von Arabinose und Galaktose, seltener einen Zucker allein auskristallisieren läßt.

Die Zucker wurden identifiziert durch ihre spezifische Drehung, die Galaktose auch noch durch ihre Oxydation zu Schleimsäure durch Salpetersäure in der Hitze. Ferner wurden die betreffenden Diphenyl- und Benzylphenylhydrazone hergestellt und durch Schmelzpunkt- bzw. Stickstoffbestimmung als Arabinose- und Galaktosederivate erkannt.

Da bei der Salzsäuredestillation der Pektinsäure Furfurol sowohl aus der Galakturonsäure wie auch aus der Arabinose entsteht, ist es zur quantitativen Bestimmung der Arabinose notwendig, die aus der Menge des abgespaltenen Kohlendioxyds ermittelte Galakturonsäuremenge in Furfurolphlorogluzid umzurechnen und diesen Wert von

dem Gesamtfurfurolphlorogluzid. das bei der Salzsäuredestillation der Pektinsäure erhalten wird, zu subtrahieren. Nach dieser Berechnung wurden *11,7 Proz. Arabinose* in der *Pektinsäure* gefunden.

Es ist also sowohl in der Arabankomponente wie in der Pektinsäurekomponente des Pektins Arabinose enthalten, was bisher übersehen worden war. Während aber das Araban schon durch heißes Wasser aus dem Pektin abgespalten ist, wird hierbei die offenbar ebenfalls als Anhydrid vorliegende Arabinose der Pektinsäure nicht losgetrennt. Sie scheint also in einer anderen Bindung wie das Araban in dem Pektinsäuremolekül verkettet zu sein.

Der Galaktoseanteil in der Pektinsäure wurde festgestellt, indem durch Titration mit *Fehling*scher Lösung, kombiniert mit den Werten der Furfuroldestillation, in dem Arabinose und Galaktose enthaltenden Zuckersirup der Pektinsäurespaltung das Verhältnis der beiden Zucker zueinander berechnet wurde. Es wurden zu 47,2 Proz. Arabinose und 52,8 Proz. Galaktose gefunden. Hieraus läßt sich der Gehalt an *Galaktose* in der *Pektinsäure* zu *13,1 Proz.* berechnen.

Die für Galaktose und Arabinose angegebenen Mengenverhältnisse können natürlich nur Annäherungswerte darstellen, da es an geeigneten sicheren Methoden zur Abscheidung und Bestimmung dieser beiden Zucker unter den hier gegebenen Bedingungen vorläufig noch fehlt.

So viel scheint aber sicher, daß Arabinose und Galaktose in stöchiometrischen Verhältnissen sich in dem Pektinsäuremolekül anhydridartig gebunden vorfinden. Durch Barytwasser scheint schon in der Kälte eine Loslösung dieser Anhydride von dem Galakturonsäurekomplex zu erfolgen. Wenigstens wurde im Filtrat des digalakturonsauren Bariums eine linksdrehende, schwach reduzierende Verbindung eines Saccharids beobachtet, die beim Erhitzen mit Säuren reduzierende, rechtsdrehende Zucker lieferte, unter denen sich Arabinose und Galaktose zu befinden schienen. Hierüber sind weitere Untersuchungen im Gange.

Das durch Salzsäuredestillation der Pektinsäure erhaltene Furfurol-Phlorogluzid ist zu einem gewissen Prozentsatz in Alkohol löslich (etwa 6 Proz.), was auf Methylpentosen hindeuten würde. Nach *Votoček*[1]) liefern bekanntlich Methylpentosen bei der Salzsäuredestillation nach *Tollens* Methylfurfurol, dessen Phlorogluzid in Alkohol löslich ist. Man folgert daher aus der Alkohollöslichkeit der aus dem *Tollens*schen Verfahren sich ergebenden Phlorogluzidniederschläge gewöhnlich den Gehalt eines Kohlenhydratgemisches an Methylpentosen.

---

[1]) Ber. **30**, 1195, 1897.

Der Nachweis von Methylpentosen nach *Rosenthaler*[1]) — charakteristische Rotfärbung beim Erhitzen mit Salzsäure und Aceton — verläuft aber in dem Zuckersirup der Pektinsäurespaltung *negativ*, so daß anzunehmen ist, daß die größere Menge der alkohollöslichen Anteile des Phlorogluzids auf der Gegenwart von Zersetzungsprodukten beruht, die *aus der Galakturonsäure selbst* entstanden sind.

Für die Annahme *v. Fellenbergs*, daß im Rübenpektin *Methylpentosen* vorhanden wären, läßt sich demnach *kein Beweis* erbringen.

Auf Grund der quantitativen Bestimmungen, die im vorigen gekennzeichnet sind, ist der Schluß berechtigt, daß weitere Bausteine der Pektinsäure nicht vorhanden sind. Die folgende Zusammenstellung gibt noch einmal eine Übersicht über Art und Menge der einzelnen Bestandteile.

100 Teile der völlig getrockneten Pektinsäure liefern bei vollkommener Aufspaltung folgende Substanzmengen:

	64,8 Teile	Galakturonsäure
	12,8 ,,	Essigsäure
	13,1 ,,	Galaktose
	11,7 ,,	Arabinose
	6,7 ,,	Methylalkohol
Im ganzen	109,1 Teile	

Ob es sich hier um definitive Werte handelt und ob nicht einzelne dieser Zahlen bei Untersuchung weiterer Präparate von Pektinsäure, besonders solcher, die direkt aus frischen Rüben hergestellt sind, eine gewisse Korrektur erfahren werden, bleibt noch festzustellen. Da die technischen Rübentrockenschnitzel, die hauptsächlich verwendet wurden, ein durch Überhitzung und Wasserdampf partiell denaturiertes Material darstellen, so erscheint es wohl möglich, wie schon erwähnt, daß beim fabrikativen Trocknen durch hydrolytische Vorgänge ein kleiner Teil Essigsäure und vielleicht auch Methylalkohol bereits daraus abgespalten worden ist, so daß in der ursprünglichen Pektinsäure der Prozentsatz dieser Verbindungen vielleicht noch höher zu veranschlagen ist.

Immerhin kann man mit aller Reserve schon auf Grund der vorliegenden Zahlen sich ein ungefähres Bild von dem *chemischen Aufbau des Pektinsäuremoleküls* machen. Nimmt man danach an, daß dieser Komplex sich aufbaut aus 4 mol. Galakturonsäure, 2 mol. Methylalkohol, 3 mol. Essigsäure, 1 mol. Arabinose und 1 mol. Galaktose unter Austritt von 10 mol. H_2O, so würde der wasserfreien Rüben-Pektinsäure die

[1]) Ann. d. Chem. 48, 167, 1909.

Bruttoformel $C_{43}H_{62}O_{37}$ zukommen. Bei der totalen Hydrolyse würde ihr Zerfall nach folgender Gleichung stattfinden:

$$\underset{\text{Rüben-Pektinsäure}}{C_{43}H_{62}O_{37}} + 10\,H_2O = 4\,\underset{\text{Galakturonsäure}}{C_6H_{10}O_7} + 2\,\underset{\text{Methylalkohol}}{CH_3OH} + 3\,\underset{\text{Essigsäure}}{CH_3CO_2H}$$
$$+ \underset{\text{Arabinose}}{C_5H_{10}O_5} + \underset{\text{Galaktose}}{C_6H_{12}O_6}.$$

Berechnet man auf dieser Grundlage prozentisch die Mengenverhältnisse der einzelnen Spaltprodukte, wie sie sich theoretisch aus der angenommenen Formel der Pektinsäure ergeben müßten, so stimmen diese, wie das folgende Schema zeigt, mit den gefundenen Zahlen bei Berücksichtigung der teilweisen Unvollkommenheit der Methodik mit leidlicher Annäherung überein:

	Mol.-Gew.	Prozente des Pektinsäuremoleküls	
		Berechnet	Gefunden *)
Für 4 Mol. Galakturonsäure . . .	776	66,3	64,8
„ 2 „ Methylalkohol	64	5,5	6,7
„ 3 „ Essigsäure	180	15,4	12,8
„ 1 „ Arabinose	150	12,8	11,7
„ 1 „ Galaktose	180	15,4	13,1
	1350	115,4	109,1
— 10 Mol. H_2O =	180		
$C_{43}H_{62}O_{37}$	1170		

*) In der vollkommen getrockneten Pektinsäure.

Auch die Werte der Elementaranalysen von Pektinsäurepräparaten, die nach verschiedenen Verfahren gewonnen waren, zeigen nur wenig Abweichung von den theoretisch errechneten Zahlen:

Für $C_{43}H_{62}O_{37}$, auf aschefreie Substanz bezogen.

	C	H	O
Ber.:	C 44,1	H 5,3	O 50,6
Gef.:	C 43,27	H 5,40	O 51,33
	C 43,44	H 5,14	O 51,42
	C 44,07	H 5,40	O 50,53
	C 43,46	H 5,47	O 51,07

Nimmt man an, daß die Rüben-Pektinsäure eine Estersäure darstellt, in deren Komplex von den 4 Molekülen der darin enthaltenen Galakturonsäure zwei Carboxylgruppen mit 2 Molekülen Methylalkohol verestert sind, die anderen beiden sich aber frei als solche vorfinden, entsprechend der ausgeschriebenen Formel

$$C_{37}H_{54}O_{29} \cdot (COOCH_3)_2(COOH)_2,$$

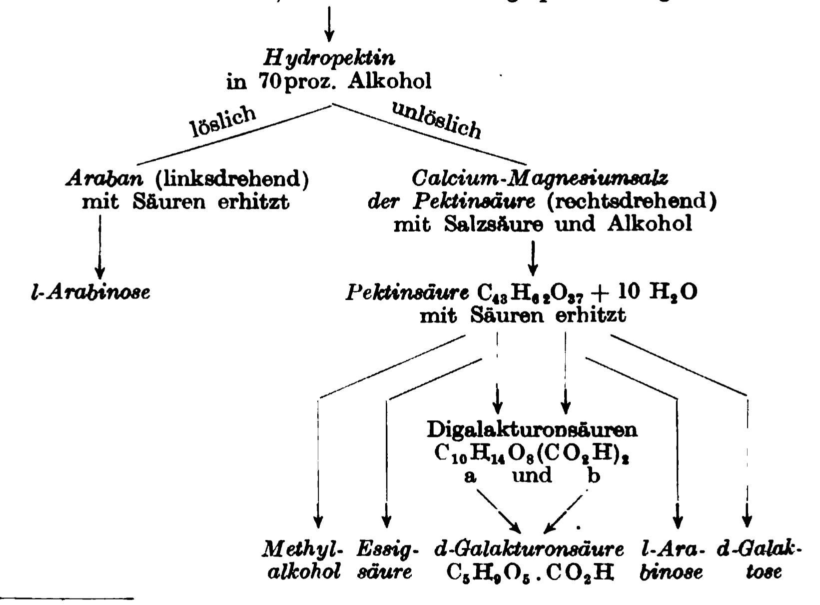
so wäre demnach die freie Pektinsäure eine zweibasische Säure, von der 1 g theoretisch zur Neutralisation 17,1 ccm n/10 NaOH erfordern würde. Praktisch hat sich ergeben, daß 1 g der Säure, die immer noch

geringe Mengen Asche aufwies, gegen Phenolphthalein in drei Fällen von 16,5, 16,6, 14,8 ccm n/10 NaOH neutralisiert wurde.

Eine in wässeriger Lösung mit der im Vakuum bei 100° getrockneten Pektinsäure ausgeführte Molekulargewichtsbestimmung ergab eine Molekulargröße von *1380*, während sich aus der obigen Formel 1170 berechnet. Die Übereinstimmung ist noch auffallender, wenn man bedenkt, daß die vakuumtrockene Pektinsäure an der Luft regelmäßig 12 bis 15 Proz. Wasser anzieht, daß sich also auch in wässeriger Lösung ihr Molekül um das entsprechende Gewicht vermehren wird. Bei Annahme von 10 mol. Konstitutionswasser würde der Formel der Pektinsäure $C_{43}H_{62}O_{37} . 10\,H_2O$ das Molekulargewicht 1350 zukommen, das mit dem praktischen Befunde identisch erscheint.

Fast alle Analysendaten stimmen also auf die oben entwickelte Formel für die Pektinsäure, die weiterhin noch durch die Beobachtungen an der Pektinsäure des Flachses[1]) eine wesentliche Stütze erfährt. Die *Rüben-Pektinsäure* wäre also eine *Triacetyl-Arabino-Galakto-dimethoxy-Tetragalakturonsäure.*

Eine Übersicht über den genetischen Zusammenhang der einzelnen Spaltprodukte des Pektins gibt das folgende Schema:



[1]) Vgl. die später in dieser Zeitschrift folgende Arbeit von *F. Ehrlich* und *F. Schubert*.

Experimenteller Teil.

Darstellung des Hydropektins aus Rübenmark.

Als Ausgangsmaterial für die folgenden Untersuchungen diente teils aus frischen Zuckerrüben hergestelltes Rübenmark, vorwiegend aber im Zuckerfabrikbetriebe ausgelaugte und getrocknete Rübenschnitzel.

Das Rübenmark war im Dezember 1918 im hiesigen Institut durch Zerreiben der gewaschenen Rüben zu feinem Brei, Entfernung des Saftes durch wiederholtes Auspressen und durch mehrfaches Auslaugen des Preßrückstandes mit kaltem Wasser, Alkohol und Äther hergestellt und an der Luft getrocknet worden. Aus 23 Rüben im Gesamtgewicht von 11,45 kg ergaben sich nach diesem Verfahren 730 g lufttrockenes Rübenmark — d. h. 6,4 Proz. auf Rüben gerechnet — in Form einer spezifisch sehr leichten, hellgrauen, lockeren und faserigen Masse.

Diese Methode der Rübenmarkherstellung war gewählt worden, um möglichst die gesamte in den Rüben befindliche wasserunlösliche Pektinsubstanz zu gewinnen.

Es wurden nun 100 g lufttrockenes Rübenmark verschiedene Male mit je 2 Liter destillierten Wassers bei verschiedenen Temperaturen in einem bedeckten Emailletopf ausgelaugt, wobei das Material nach jeder Auslaugung in einer Hebelpresse scharf abgepreßt wurde.

Bis zu einer Temperatur von etwa 55° gingen in die wässerigen Auszüge meist nur anorganische Bestandteile, Zucker und organische Nichtzuckerstoffe. In diesen Extrakten war die Orcinreaktion auf Pentosen negativ, während die α-Naphtholreaktion auf Kohlenhydrate positiv ausfiel. Bei der vierten Auslaugung bei 55° wurde nur noch eine schwache α-Naphtholreaktion erhalten, bei der fünften Extraktion bei 55° fiel sie negativ aus. In Übereinstimmung hiermit wurden die Auszüge, die zuerst eine schwache Rechtsdrehung zeigten, optisch inaktiv.

Aus diesen Versuchen ging also hervor, daß mit Wasser von 55° die Auslaugung des Rübenmaterials ohne Verluste an Pektin am günstigsten verlief. Nunmehr wurde das zuckerfreie Rübenmark bei höheren Temperaturen mit Wasser extrahiert, wobei das Pektin in steigendem Maße löslich gemacht und in *Hydropektin* übergeführt wurde. Dieser Lösungsprozeß macht sich schon recht deutlich bei Anwendung von Wasser von 80° bemerkbar, indem in den Extrakten sowohl eine neu auftretende Rechtsdrehung als auch der positive Ausfall der Orcin- und Naphthoresorcinreaktion das in Lösung gegangene Pektin anzeigte (s. Tabelle I).

Die ersten Extrakte bei höherer Temperatur von 80° an zeigten eine Rechtsdrehung, die aber allmählich nachließ und bei längerer Einwirkung des Wassers in Linksdrehung überging (s. Tabelle II). Diese Tatsache ist damit zu erklären, daß das heiße Wasser schon teilweise weiter hydrolysierend auch auf die gelösten Stoffe einwirkt und daß dabei Substanzen von niedrigerer Rechtsdrehung entstehen, die sich mit der Linksdrehung des Arabans gerade ausgleichen oder letztere sogar überwiegen lassen. Aus den Tabellen I und II ist ersichtlich, wie die Auslaugung mit Wasser verschiedener Temperaturen in den einzelnen Phasen verläuft. Der Hauptteil des Hydropektins geht danach bei 90 bis 100° durch etwa zehn- bis zwölfmal wiederholtes Auslaugen, das mit jedesmal frischem Wasser je 1 Stunde lang durchgeführt wurde, in Lösung. Es zeigte sich, daß das in dieser Weise behandelte Rübenmaterial noch weitere Mengen Hydropektin abgab, wenn man es im Autoklaven auf 1 bis 2 Atmosphären Überdruck mit Wasser erhitzte. Die Auszüge waren in diesem

Falle aber viel dunkler bräunlich gefärbt, was auf bereits eingetretene weitergehende Zersetzungen des Hydropektins hindeutete.

Aus den nachstehenden Tabellen sind auch wichtig für die folgende Trennung der Komponenten des Hydropektins die Mengen der in 70proz. Alkohol löslichen und unlöslichen Bestandteile des Hydropektins.

Tabelle I.

Auslaugung von 100 g lufttrockenem Rübenmark mit je 2 Liter Wasser.

Temperatur	Zeit	Drehung d. wässer. Extrakts l = 2	Reaktionen		Ausgelaugte Substanz	Davon in 70 Proz. Alkohol		Drehung d. alkohol. Lös. (200 ccm) l = 2
	Min.	° Sacch.	auf Orcin	auf Naphthoresorcin	g	unlöslich g	löslich g	° Sacch.
55°	15	+ 1,3	—	—	17 g (Sirup)	(Substanz in g, 2 Stdn. bei 105° getrocknet)		
55	15	+ 0,3	—	—				
55	20	+ 0,2	—	—				
55	30	0	—	—	0,7			
55	30	0	—	—	0,3			
80	30	+ 1,0	+	+	1,73	1,50	0,23	— 0,5
85	30	+ 0,7	+	+	1,81	1,04	0,77	— 0,3
85	30	+ 0,4	+	+	2,10	1,34	0,76	— 0,4
90	30	+ 0,7	+	+	3,59	1,78	1,81	— 1,0
90	30	+ 2,2	+	+	5,91	3,71	2,20	— 1,0
90	60	+ 0,7	+	+	2,29	1,33	0,96	— 0,6
95	30	+ 0,6	+	+	1,70	1,23	0,47	— 0,5
100	60	+ 1,0	+	+	3,23	2,47	0,76	— 1,7
100	60	+ 0,7	+	+	2,96	1,85	1,11	— 1,7
100	60	+ 0,4	+	+	2,69	1,65	1,04	— 1,8
100	60	+ 0,3	+	+	1,92	1,23	0,69	— 1,5
100	30	+ 0,2	+	+	1,51	0,95	0,56	— 1,0
100	60	0	+	+	1,43	0,95	0,48	— 1,4
100	60	0	+	+	1,07	0,59	0,48	— 1,0
100	60	0	+	+	1,12	0,75	0,37	— 1,3
100	60	0	+	+	0,84	0,50	0,34	— 0,8
100	60	0	+	+	1,14	0,71	0,43	— 0,7
121	60	0	+	+	4,46	2,91	1,55	— 2,7
121	60	0	+	+	3,19	2,02	1,17	— 1,5
121	60	0	+	+	1,65	1,19	0,46	— 0,3
121	60	0	+	+	0,90	0,54	0,36	— 0,1
121	60	0	+	+	0,39	0,20	0,19	0
					47,63 Hydropektin	**30,44** Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure	**17,19** Araban	

Zur Gewinnung des Hydropektins wurden die bei den einzelnen Auslaugungen erhaltenen wässerigen Extrakte von Zellfasern und sonstigen schwebenden Verunreinigungen durch Kolieren durch Leinwand befreit und die klaren Filtrate auf dem Wasserbad in Porzellanschalen zur Trockne verdampft. Es hinterblieb das *Hydropektin* in Form von gelblichen bis bräunlichen gelatineartigen Blättchen, die sich leicht von dem Porzellan abheben ließen.

Um die Ausbeute an Hydropektin zu bestimmen, wurde der Feuchtigkeitsgehalt des Rübenmarks festgestellt.

Tabelle II.

Auslaugung von 300 g lufttrockenem Rübenmark mit je 6 Liter Wasser.

Temperatur	Zeit in Stunden	Drehung d. wässer. Extrakts °Sacch. l = 2	Ausgelaugte Substanz g	1 g ausgelaugte Substanz (bei 100° getrocknet): in 20 ccm Wasser Drehung der wäss. Lösung °Sacch. (l = 1)	1 g ausgelaugte Substanz (bei 100° getrocknet): in 20 ccm 70 proz. Alkohol Drehung der alkoh. Lösung °Sacch. (l = 2)	5 ccm der wässr. Lösung neutralisieren ccm n/10 NaOH	
60°	$1^1/_2$	+ 1,4					Zucker und andere lösliche Bestandteile
60	$1^1/_2$	+ 0,3	22,8	+ 15,2	+ 0,3	0,3	
60	2	+ 0,2					
60	2	+ 0,1	6,5	+ 15,3	— 1,2	0,3	
60	3	+ 0,9					
60	4	+ 0,3	3,7	+ 13,8	— 2,3	0,3	
60	4	+ 0,2	2,3	+ 12,2	— 1,2	0,2	
60	2	0	1,1	+ 7,4	— 1,6	0,2	
100	2	+ 2,7	14,5	+ 18,4	— 2,4	0,3	Hydropektin
100	$2^1/_2$	+ 2,0	16,2	+ 12,8	— 6,1	0,2	
100	$7^1/_2$	+ 1,0	22,6	+ 5,2	— 9,7	0,4	
100	6	— 0,3	16,2	+ 5,4	— 8,2	0,3	
100	5	— 0,4	9,5	+ 6,0	— 8,9	0,3	
100	7	— 0,4	11,0	— 1,0	— 11,6	0,3	
100	$4^1/_2$	— 0,3	6,5	— 1,2	— 9,0	0,3	
100	6	— 0,4	4,0	— 1,2	— 9,2	0,5	
121	1	— 0,3	5,4	— 0,8	— 8,6	0,5	
135	1	— 0,2	4,9	— 0,8	— 7,8	0,7	
135	1	0	2,4	— 0,6	— 7,0	0,8	
135	1	0	1,9	—	—	—	
		Im ganzen:	115,1 Hydropektin				

2,4052 g lufttrockenes Rübenmark verloren im Lufttrockenschrank bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet 0,2531 g Wasser.

Wassergehalt im lufttrockenen Rübenmark: 10,5 Proz. Wasser.

1. Auslaugungsversuch.

100 g lufttrockenes Rübenmark enthalten also 89,5 g Trockensubstanz. Aus dieser Menge wurden 47,5 g wasserbadtrockenes Hydropektin ausgelaugt.

Ausbeute: 53,1 Proz. Hydropektin, auf wasserfreies Rübenmark gerechnet.

2. Auslaugungsversuch.

300 g luftrockenes Rübenmark enthalten demnach 268,5 g Trockensubstanz. Hieraus wurden 115,1 g wasserbadtrockenes Hydropektin ausgelaugt.

Ausbeute: 42,9 Proz. Hydropektin, auf wasserfreies Rübenmark gerechnet.

Darstellung von Hydropektin aus Rübentrockenschnitzeln.

Da die Gewinnung von Rübenmark aus frischen Rüben im Laboratorium sich immerhin umständlich gestaltet, wurde bei den folgenden Versuchen weiterhin das im großen Maßstabe zur Verfügung stehende Material benutzt,

das die im Fabrikbetriebe ausgelaugten und getrockneten Rübenschnitzel bilden.

Es kamen hauptsächlich Trockenschnitzel aus der Zuckerfabrik Froebeln aus dem Jahre 1922 zur Verwendung.

Bei dem folgenden Versuche (s. Tabelle III) wurden 500 g lufttrockene Rübenschnitzel angewendet. Diese Schnitzel, die noch deutliche Mengen Zucker enthielten, wurden zuerst bei einer Temperatur von 55 bis 60° ausgelaugt bis zur negativen α-Naphtholreaktion der wässerigen Auszüge. Die Auslaugungen wurden mit je 8 Liter Wasser ausgeführt und nach jeder Extraktion das Material in einer Hebelpresse scharf abgepreßt. Bei der vierten Auslaugung bei 60° zeigte der wässerige Auszug keine α-Naphthol-reaktion und war auch nicht mehr optisch aktiv.

Tabelle III.

Auslaugung von 500 g lufttrockenen Rübentrockenschnitzeln mit je 8 Liter Wasser.

Temperatur	Dauer der Auslaugung in Stunden	Drehung der wässerigen Extrakte ° Sacch. (l = 2)	20 ccm des Extrakts neutralisieren ccm n/10 NaOH	Ausgelaugtes Hydropektin g
55—60°	2	+ 1,5		
55—60	2	+ 0,2		
55—60	2	0	(Schwache α-Naphtholreaktion)	
55—60	1	0	(Negative α-Naphtholreaktion)	
100°	1½	+ 2,6	0,2	32,2
100	1	+ 1,1	0,3	27,2
100	1	+ 1,0	0,2	27,5
100	1½	+ 1,6	0,2	30,1
100	1	+ 0,6	0,2	21,7
100	2	+ 0,5	0,3	22,1
100	2	+ 0,3	0,4	15,3
100	2	— 0,1	0,6	18,7
Im ganzen ausgelaugte Menge an Hydropektin:				194,8

Dann wurden die Rübenschnitzel mit kochendem Wasser ausgelaugt, wobei sich das in Lösung gehende Pektin durch die wieder auftretende Rechtsdrehung der Extraktionen bemerkbar machte. Bei fortschreitender Einwirkung des kochenden Wassers nahm die Acidität der Auszüge zu, was mit dem hydrolysierenden Einfluß des heißen Wassers zu erklären ist, der zu sauren Hydrolysenprodukten aus dem Pektin führt.

Die einzelnen Extraktionen bei 100° wurden durch Leinwand koliert, um sie von den suspendierten Verunreinigungen zu befreien, und in Porzellanschalen auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft.

Es hinterblieb wieder *das Hydropektin* als eine gelb bis braun gefärbte, blätterige Masse. Zur Bestimmung der Ausbeute an Hydropektin wurde der Wassergehalt der Rübenschnitzel, die das Ausgangsmaterial bildeten, festgestellt.

6,3099 g lufttrockene Rübenschnitzel verloren bei 110° im Lufttrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet 0,6540 g Wasser.

Wassergehalt der lufttrockenen Rübenschnitzel: 10,37 Proz. Wasser.

500 g zur Auslaugung verwandte lufttrockene Rübenschnitzel enthalten also 453,1 g Trockensubstanz. Aus dieser Menge wurden 194,8 g wasserbadtrockenes Hydropektin gewonnen.

Ausbeute: 43,0 Proz. Hydropektin, auf wasserfreie Rübenschnitzel gerechnet.

Araban und Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure als Bestandteile des Hydropektins.

Das so gewonnene Hydropektin ist ein Gemisch aus *Araban* und dem *Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure* und enthält noch geringe Mengen von verunreinigenden Substanzen wie Saponin. Um das Verhältnis der beiden Hauptkomponenten, das schon aus der Tabelle I in annähernder Weise aus der Menge der alkoholischen Auslaugungen ersichtlich ist, zu erfahren, wurden 50 g bei 110° getrocknetes Hydropektin, zu gleichen Teilen von den ersten vier Auskochungen bei 100° (Tabelle II) entnommen, in 1 Liter 70proz. Alkohol suspendiert und mehrere Tage bis zur Konstanz der Drehung der alkoholischen Lösung (— 7,5° Saccharose, l = 2) stehengelassen. Unter diesen Bedingungen löst sich das Araban bereits annähernd vollständig in dem 70proz. Alkohol, während das pektinsaure Salz darin unlöslich ist. Von dem unlöslich gebliebenen Salz wurde abfiltriert, dieses mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 110° getrocknet. Es wog 34,2 g.

Hiernach sind also im trockenen Hydropektin aus Rübenmark etwa *68,4 Proz. Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure* und 31,6 *Proz. Araban* vorhanden.

In gleicher Weise wurde das Hydropektin aus Rübenschnitzeln in 70proz. Alkohol suspendiert, 2 Tage stehen gelassen, dann das ungelöste Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und schließlich bei 110° getrocknet.

Bei den einzelnen Rückständen der Auslaugungen der Rübenschnitzel (Tabelle III) ergaben sich aus dem Hydropektin folgende Ausbeuten an Araban und Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure.

Hydropektin	Calcium-Magnesiumsalz d. Pektinsäure		Araban	
g	g	entspr. Proz. des Hydropektins	g	entspr. Proz. des Hydropektins
32,2	24,6	76,5	7,6	23,5
27,2	19,5	71,5	7,7	28,5
27,5	18,6	67,7	8,9	32,3
30,1	23,4	77,7	6,7	22,3
21,7	17,1	79,0	4,6	21,0

Wurde dagegen Rübenmark *direkt* mit 70proz. Alkohol mehrere Stunden lang ausgekocht, so erhielt man nur optisch inaktive alkoholische Extrakte, die beim Verdampfen geringe Mengen Saponin und fettähnliche Substanzen hinterließen und *keine Spur Araban* enthielten.

Versuche zur Darstellung und Reingewinnung von Araban.

I. Darstellung von Araban durch fraktionierte Fällungen mit Alkohol.

Die in den vorigen Versuchen erhaltenen Arabanlösungen wurden im Vakuum zur Trockne verdampft, wobei ein brauner, amorpher, etwas hygroskopischer und aschehaltiger Rückstand übrigblieb, der stark die

Orcinreaktion gibt, demnach also Pentosen enthielt. Seine Lösung reagiert schwach sauer, reduziert *Fehling*sche Lösung direkt schwach, dagegen stark nach Erhitzen mit Salzsäure, so daß zu schließen war, daß es sich hier um Anhydride von Pentosen handelte, die mit anderen Beimengungen verunreinigt waren.

Es wurde nun versucht, durch fraktionierte Alkoholfällungen aus diesem Gemisch ein reines Pentosan zu gewinnen.

Zu diesem Zwecke wurde das als alkohollöslicher Rückstand gewonnene Roharaban von der Darstellung aus Rübenmark her (in Menge von 15,8 g, S. 286) in 150 ccm 70proz. Alkohol gelöst, wobei geringe Mengen ungelöst blieben, die abfiltriert wurden. Das Filtrat wurde mit dem gleichen Volumen 96proz. Alkohol versetzt. Die Lösung trübte sich durch Ausfällung des Arabans in fein verteilter Form und erst nach längerem Stehen setzte sich das Araban als dunkelbraune, lackartige Masse ab. Die überstehende Lösung wurde dekantiert und die ausgefällte Substanz an der Luft getrocknet.

Das lufttrockene Araban (0,55 g) wurde in 20 ccm Wasser gelöst zu einer trüben, dunklen Lösung, die mit Kohle nicht zu entfärben und nicht polarisierbar war. *Fehling*sche Lösung wurde reduziert, nach Kochen mit Salzsäure bedeutend stärker. Mit Kalkwasser war das Araban nicht fällbar.

Das Filtrat dieses Arabans wurde mit demselben Volumen 96proz. Alkohol versetzt, worauf eine sirupöse Masse ausfiel, von der die überstehende Flüssigkeit abgegossen wurde. Der im Becherglas haftende, sirupöse Rückstand wurde an der Luft allmählich fest. Lufttrocken wog er 0,91 g.

0,91 g Substanz in 40 ccm Wasser gelöst. $c = 2,27$. Drehung im 0,25-dm-Rohr $\alpha_D = -0,59^\circ$, folglich

$$[\alpha]_D = -\mathbf{103,5^\circ}.$$

Die Substanz reduzierte *Fehling*sche Lösung, nach Kochen mit Salzsäure bedeutend stärker. Erwärmen mit ammoniakalischer Silberlösung bewirkte geringe Silberausscheidung. Mit Kalk- oder Barytwasser war das Araban nicht zu fällen, ebenfalls nicht mit Kupfersulfatlösung.

Die von diesem Araban dekantierte Flüssigkeit wurde mit der sechsfachen Menge 96proz. Alkohol versetzt, worauf Araban teils sirupös, teils in hellbraunen Flocken ausfiel, die nach dem Absitzen abfiltriert und 2 Stunden bei 110° getrocknet wurden.

Ausbeute: 3,1 g eines gelbbräunlichen Pulvers.

0,2494 g dieses Arabans wurden in 10 ccm Wasser gelöst, wobei die Substanzteilchen erst zu einer schleimigen Masse aufquellen und dann in Lösung gehen. $c = 2,5$. Drehung im 0,5-dm-Rohr: $\alpha_D = -1,87^\circ$, folglich

$$[\alpha]_D = -\mathbf{150^\circ}.$$

Diese Arabanlösung reduzierte *Fehling*sche Lösung schwach, nach Kochen mit Salzsäure stark. Bei Zusatz von Ammoniumoxalat entstand eine Trübung.

Zur Aschenbestimmung wurden 0,3131 g der getrockneten Substanz im Platintiegel verascht. Die Asche wog 0,0034 g, entsprechend 1,08 Proz. des Arabans, und bestand zum größten Teil aus Calcium.

II. Darstellung von Araban durch fraktionierte Auskochungen mit Alkohol.

Die vereinigten alkoholischen Arabanlösungen aus dem Hydropektin aus Rübenschnitzeln wurden im Vakuum auf ein kleines Volumen einge-

dampft, wobei geringe Mengen eines graubraunen Niederschlags ausfielen, die abfiltriert wurden. Dann wurde die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft und der braun gefärbte Rückstand sechsmal mit je 250 ccm 96proz. Alkohol am Rückflußkühler auf dem Wasserbad je 20 Minuten lang ausgekocht.

Drehung der alkoholischen Lösung.

Auskochung	° Saccharose (l = 0,5)	Auskochung	° Saccharose (l = 0,5)
1.	— 1,0	4.	— 0,4
2.	— 0,5	5.	— 0,3
3.	— 0,4	6.	— 0,4

Die einzelnen Auskochungen wurden einzeln im Vakuum zur Trockne verdampft.

Zu 1. Es konnte nur ein Sirup erhalten werden (5,8 g). Dieser wurde in 100 ccm Wasser gelöst. $c = 0{,}58$. Drehung im 0,5-dm-Rohr: $a_D = -0{,}73^0$.

$$[a]_D = -25{,}2^0.$$

Die Lösung reagiert stark sauer und reduziert *Fehling*sche Lösung stark.

Zu 2. Ein hellbrauner, hygroskopischer Rückstand (1,48 g), der in 50 ccm Wasser gelöst wurde. $c = 2{,}96$. Drehung im 0,5-dm-Rohr: $a_D = -0{,}56^0$.

$$[a]_D = -37{,}8^0.$$

Die Substanz reagiert sauer und reduziert *Fehling*sche Lösung.

Zu 3. Ein hellbrauner Rückstand (0,66 g), der in 50 ccm Wasser gelöst wurde. $c = 1{,}32$. Drehung im 0,5-dm-Rohr: $a_D = -0{,}43^0$.

$$[a]_D = -65{,}2^0.$$

Die Lösung reagiert schwach sauer und reduziert *Fehling*sche Lösung.

Zu 4. Ein gelblicher Rückstand (0,28 g), der in 20 ccm Wasser gelöst wurde. $c = 1{,}4$. Drehung im 1-dm-Rohr $a_D = -1{,}04^0$.

$$[a]_D = -74{,}3^0.$$

Die Lösung reagiert schwach sauer und reduziert *Fehling*sche Lösung.

Zu 5. Ein hellgelber Rückstand (0,09 g), der in 10 ccm Wasser gelöst wurde. $c = 0{,}9$. Drehung im 0,5 dm-Rohr $a_D = -0{,}42^0$.

$$[a]_D = -93{,}3^0.$$

Die Lösung ist neutral und reduziert *Fehling*sche Lösung nur schwach.

Zu 6. Die Menge des Rückstandes ist zu gering für eine Drehung, er reduziert *Fehling*sche Lösung schwach, nach Kochen mit Salzsäure stark. Die Substanz ist aschenhaltig, und zwar bestand die Asche vorwiegend aus Calcium.

Der nach sechsmaligem Auskochen, wie beschrieben, in Alkohol unlöslich verbleibende Rückstand (26,5 g) wurde in 200 ccm Wasser gelöst. $c = 13{,}25$. Drehung der filtrierten Lösung im 0,25-dm-Rohr: $a_D = -3{,}75^0$.

$$[a]_D = -113{,}3^0.$$

Die Flüssigkeit war schwach sauer und reduzierte auch *Fehling*sche Lösung nur schwach, nach dem Kochen mit Salzsäure aber stark.

Da die Lösung stark schäumte, wurde sie noch auf Saponin untersucht. Eine kleine Probe wurde mit Salzsäure gekocht. Hierbei schieden sich geringe Mengen einer weißen Substanz ab, wahrscheinlich die Rübenharzsäure[1]) aus dem Saponin, worauf der positive Ausfall der *Liebermann*schen Reaktion mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure hindeutete.

Die letzterhaltene Arabanlösung wurde schwach mit Salzsäure angesäuert und das 20fache Volumen 96proz. Alkohols zugegeben. Nach dem Absitzen des sirupartig ausfallenden Niederschlages wurde abgegossen, das gefällte Araban mit 96proz. Alkohol bis zur Entfernung der Salzsäure durchrührt, dann in 200 ccm 60proz. Alkohols gelöst und mit 1 Liter 96proz. Alkohol wieder ausgefällt. Das sirupös ausgefallene Araban wurde in wenig Wasser gelöst und im Vakuum vollkommen zur Trockne verdampft zu einer hellbraunen, pulverigen Masse.

Dieses Araban (7,35 g) wurde in 300 ccm 1proz. Schwefelsäure gelöst. $c = 2{,}45$. Drehung im 1-dm-Rohr $\alpha_D = -10{,}9^0$ Saccharose oder $-3{,}78^0$.

$$[\alpha]_D = -154{,}8^0.$$

Die Lösung wurde am Rückflußkühler zuerst auf dem Wasserbad erhitzt und dann über freier Flamme gekocht.

Anfangsdrehung	— 10,9°	Saccharose (l = 1)
nach 15 Minuten langem Erhitzen auf dem Wasserbade	— 7,0	,,
nach weiteren 10 Minuten langem Kochen	+ 4,1	,,
,, ,, 10 ,, ,, ,,	+ 6,2	,,
,, ,, 10 ,, ,, ,,	+ 6,6	,,
,, ,, 10 ,, ,, ,,	+ 6,6	,,

Nach etwa ¾ Stunden ist die Drehung der Lösung konstant geworden. Nunmehr wurde die Flüssigkeit auf dem Wasserbad heiß mit Bariumcarbonat neutralisiert, von Bariumsulfat abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wurde zweimal mit 96proz. und darauf zweimal mit 90proz. Alkohol ausgekocht. Schon aus der abgekühlten alkoholischen Lösung schied sich Arabinose kristallinisch aus. Sie wurde abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Arabinose I = 2,0 g.

Die alkoholische Lösung wurde zum Sirup eingedampft. Nach einigem Stehen schied sich eine zweite Kristallisation aus. Die Kristallmasse wurde mit 90proz. Alkohol verrieben, abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Arabinose II = 1,1 g.

Das Filtrat wurde wieder zu Sirup eingedampft, worauf eine dritte Kristallisation erfolgte.

Arabinose III = 2,1 g.

---

[1]) *Andrlík* und *Votoček*, Ber. d. Versuchsstation f. Zuckerindustrie in Prag 1897, S. 11; Zeitschr. f. Zuckerindustrie in Böhmen 1898, S. 248.

Das Filtrat wurde nicht weiter untersucht.

Gesamtausbeute: 5,2 g kristallisierte l-Arabinose aus 7,35 g Araban.

Arabinose	I	zeigte	$[\alpha]_D = +\ 100{,}7^0$
„	II	„	$[\alpha]_D = +\ 96{,}6^0$
„	III	„	$[\alpha]_D = +\ 101{,}5^0$

Elementaranalyse der Arabinose I (2 Tage im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet).

0,1609 g Substanz: 0,2314 g CO_2, 0,0951 g H_2O.

$C_5H_{10}O_5$. Ber.: C 39,97, H 6,67.
Gef.: C 39,23, H 6,61.

III. Versuch einer Reinigung des Arabans durch fraktionierte alkoholische Auskochungen nach vorangegangener Dialyse.

In einem weiteren Falle wurde das aus Hydropektin von Rübenschnitzeln mit 70proz. Alkohol erhaltene Roharaban, in Wasser gelöst, zunächst der Dialyse unterworfen, indem man die etwa 35proz. wässerige Lösung mit Toluol überschichtet in einem Pergamentschlauch mehrere Tage in einem großen, mit destilliertem Wasser gefüllten Zylinder einhängte. Nach 3 Tagen ergab die Außenflüssigkeit, zur Trockne verdampft, einen braun gefärbten Rückstand mit der spezifischen Drehung $[\alpha]_D = -\ 62{,}5^0$. Die Dialyse wurde mit frischem Wasser wiederholt, wobei sich die spezifische Drehung des herausdialysierten Körpers auf $[\alpha]_D = -\ 115^0$ erhöhte.

Dann wurde die im Schlauch zurückgebliebene Arabanlösung im Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand mit Alkohol verschiedener Konzentration fraktioniert ausgekocht.

					$[\alpha]_D =$
1.	Mit 96proz. Alkohol ausgekocht	1,4 g	Araban	mit	$-\ 114{,}5^0$
2.	„ 96 „ „ „	1,4 g	„	„	$-\ 135{,}3^0$
3.	„ 96 „ „ „	0,7 g	„	„	$-\ 142{,}3^0$
4.	„ 96 „ „ „	0,5 g	„	„	$-\ 140{,}5^0$
5.	„ 90 „ „ „	0,6 g	„	„	$-\ 145{,}7^0$
6.	„ 90 „ „ „	0,4 g	„	„	$-\ 156{,}0^0$

7. Mit 80proz. Alkohol erhitzt, löst sich der gesamte Arabanrückstand zu einer braunen Lösung, die sich mit Tierkohle etwas entfärben ließ und, im Vakuum zur Trockne verdampft, einen hellbraunen Rückstand ergab, der eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D = -\ 173{,}5^0$ besaß. Die Substanz reagierte in wässeriger Lösung sehr schwach sauer und reduzierte *Fehling*sche Lösung in geringem Maße.

Die Substanz von der dritten alkoholischen Auskochung wurde im Vakuum bei 78° über Phosphorpentoxyd getrocknet und damit eine *Pentosenbestimmung* nach der Salzsäuredestillationsmethode von *Tollens* angestellt:

Angewandte Substanz . . . . 0,1069 g
Erhaltenes Furfurol-Phlorogluzid. . . . 0,0760 g,

dem entspricht 0,0897 g Arabinose oder *83,9 Proz. Arabinose.*

Elementaranalyse der Substanz von der sechsten alkoholischen Auskochung (im Vakuum bei 78° über Phosphorpentoxyd getrocknet).

0,0841 g Substanz: 0,1287 g CO_2, 0,0437 g H_2O, 0,0004 g Asche.

Nach Abzug der Asche (4,7 Proz.) berechnet sich auf 0,0837 g aschenfreie Substanz bezogen:

	Gef.:	C 41,94	H 5,84	O 52,22
$2 (C_5H_{10}O_5) - H_2O$.	Ber.:	C 42,55	H 6,38	O 51,07
$3 (C_5H_{10}O_5) - 2 H_2O$.	Ber.:	C 40,60	H 6,75	O 52,65

IV. Verschiedene Abänderungen der Darstellungsweise von Araban.

Um das durch Säuren sowie durch Aschenbestandteile von vornherein noch stark verunreinigte Roharaban in anderer Weise zu reinigen, wurden folgende Versuche angestellt.

a) Behandlung des Roharabans mit Calciumcarbonat.

Roharaban aus Hydropektin von Rübenschnitzeln wurde in wässeriger Lösung mit Calciumcarbonat bis zur Neutralisation auf dem Wasserbad erhitzt, die Lösung filtriert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Dieser braun gefärbte Rückstand wurde wie oben mit Alkohol verschiedener Konzentration ausgekocht, ohne daß es jedoch möglich gewesen wäre, nach dem Eindampfen der alkoholischen Lösungen Substanzen zu erhalten, die frei von Asche oder ohne Reduktionsvermögen waren. Die Drehung der Rückstände der einzelnen Auskochungen erhöhte sich von anfangs $[\alpha]_D = -86,8^0$ bis zu $[\alpha]_D = -140^0$ in den letzten Fraktionen.

b) Behandlung des Roharabans mit Kalkwasser.

7,4 g luftrockenes Roharaban, das durch Auslaugen von Hydropektin aus Rübenschnitzeln erhalten war, wurde in 50 ccm Wasser gelöst und Kalkwasser bis zur deutlich alkalischen Reaktion zugegeben. Dann wurde unter Erhitzen Kohlensäure eingeleitet zur Ausfällung des überschüssig gelösten Kalkes. Die Lösung wurde nach dem Filtrieren im Vakuum zur Trockne eingedampft und der bräunlich gefärbte Rückstand darauf hintereinander mit Alkohol verschiedener Konzentration ausgekocht.

1. *Auskochung* mit 250 ccm 96proz. Alkohol (1 Stunde). Die alkoholische Lösung ergab, im Vakuum zur Trockne verdampft, einen braunen Rückstand (1,34 g), der calciumhaltig war und *Fehling*sche Lösung reduzierte. Das spezifische Drehungsvermögen dieser Substanz war $[\alpha]_D = -94,4^0$.

2. Eine zweite Auskochung mit 96proz. Alkohol ergab eine Substanz (0,32 g) mit der spezifischen Drehung $[\alpha]_D = -124,7^0$.

3. Durch eine dritte Auskochung mit 90proz. Alkohol wurde ein Araban (0,96 g) erzielt mit $[\alpha]_D = -135,7^0$.

4. Beim Auskochen mit 80proz. Alkohol löste sich der gesamte Arabanrückstand zu einer trüben, braunen Lösung. Die filtrierte Lösung ergab, im Vakuum zur Trockne verdampft, einen braunen, etwas hygroskopischen Rückstand (1,8 g), der eine spezifische Drehung $[\alpha]_D = -170^0$ besaß. Dieses Araban wurde zweimal mit 90proz. Alkohol ausgekocht, wobei Substanzen (0,45 g) ausgelaugt wurden von $[\alpha]_D = -150^0$.

Der in 90proz. Alkohol unlösliche Anteil des Arabans zeigte im Vakuum bei 78° über Phosphorpentoxyd getrocknet das spezifische Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -172,9^0$.

Der gelbbräunliche Körper war nur wenig aschenhaltig, zeigte nur schwach saure Reaktion und besaß eine geringe Reduktionsfähigkeit.

Elementaranalyse des letztgewonnenen vakuumtrockenen Arabans

0,1621 g Substanz: 0,2642 g CO_2, 0,0861 g H_2O, 0,0017 g Asche; auf aschenfreie Substanz (0,1604 g) bezogen:

für $2\,C_5H_{10}O_5 - 2\,H_2O$.	Ber.: C 45,4	H 6,1	O 48,5
	Gef.: C 44,92	H 5,97	O 49,11

c) Behandlung des Arabans mit Barytwasser.

Roharaban von Hydropektin aus Rübenschnitzeln wurde in Wasser gelöst und Barytwasser bis zur alkalischen Reaktion zugesetzt. Dann wurde Kohlensäure zur Fällung des überschüssigen Bariums eingeleitet und erhitzt, hiernach filtriert und die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft. Durch fraktionierte Auskochung mit Alkohol fallender Konzentration (96- bis 84proz.) ließen sich Substanzen erzielen mit $[\alpha]_D = -55,6^0$ bis $[\alpha]_D = -119,3^0$. Mit der höheren spezifischen Drehung nahm die Reduktionsfähigkeit ab.

Der schließlich in 84proz. Alkohol unlöslich verbleibende Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und mit einem großen Überschuß von Alkohol versetzt, worauf ein gelbbrauner Niederschlag ausfiel, der, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet, ein spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -101,3^0$ zeigte. Die Lösung dieser Substanz reagierte neutral, reduzierte *Fehling*sche Lösung nur wenig, enthielt aber Bariumionen.

Um ein aschenärmeres Produkt zu erhalten, wurde die Substanz in wenig Wasser gelöst, mit Schwefelsäure schwach angesäuert und die nach dem Filtrieren klare Lösung in Alkohol eingetropft. Das ausfallende, gelbbraun gefärbte Araban wurde abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und zeigte, im Vakuum bei 78° getrocknet, eine spezifische Drehung $[\alpha]_D = -99,4^0$. Die Lösung der Substanz reagierte schwach sauer und reduzierte wenig. Der Körper besaß geringen Aschengehalt.

d) Behandlung des Roharabans mit Bleicarbonat.

Roharaban aus Hydropektin von Rübenschnitzeln wurde in Wasser gelöst und unter Erhitzen auf dem Wasserbad Bleicarbonat zur Neutralisation zugegeben. Die filtrierte Lösung ergab, im Vakuum zur Trockne verdampft, einen braun gefärbten Rückstand, der mit 95proz. Alkohol ausgekocht wurde. Hierbei gingen Substanzen in Lösung, die eine verhältnismäßig niedrige spezifische Drehung ($[\alpha]_D = -59,7^0$) zeigten und *Fehling*sche Lösung deutlich reduzierten.

Der in 95proz. Alkohol unlösliche Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und die Lösung mit Alkohol übersättigt, worauf ein gelblicher, flockiger Niederschlag ausfiel. Dieser Niederschlag wurde abgesaugt und in 70proz. Alkohol suspendiert, worin er bis auf geringe Mengen in Lösung ging.

Der hierbei ungelöst verbleibende Rückstand zeigte nach dem Abfiltrieren und Trocknen eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D = -19,2^0$. Er war bleihaltig und gab deutlich positive Orcin- und Naphthoresorcinreaktion, so daß anscheinend ein Gemisch von Araban und dem Bleisalz einer Galakturonsäure oder Saponin enthaltenden Substanz vorlag.

Die alkoholische Arabanlösung, von der der eben beschriebene Niederschlag abfiltriert worden war, wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, wodurch man zu einem gelbbraunen, schwach sauren und schwach reduzierenden Araban gelangte, das, im Vakuum bei 78° getrocknet, eine spezifische Drehung $[\alpha]_D = -149,4^0$ zeigte.

Elementaranalyse des vakuumtrockenen Arabans.

0,1999 g Substanz: 0,3093 g CO_2, 0,1053 g H_2O, 0,0028 g Asche.

Nach Abzug der Asche (1,4 Proz.) berechnet sich:

für $2\,C_5H_{10}O_5 - H_2O$.	Ber.:	C 42,55	H 6,38	O 51,07
	Gef.:	C 42,8	H 5,98	O 5,22

V. Araban, durch Eintragen von Hydropektinlösung in Alkohol erhalten.

Um ein Araban zu bekommen, das möglichst schonend behandelt und nur kurze Zeit der Wärme ausgesetzt war, wurden frisch hergestellte Hydropektinauszüge aus Rübenschnitzeln nicht vollkommen zur Trockne eingedampft, sondern nur auf ein kleineres Volumen, und dieses in Alkohol eingetragen, so daß eine Flüssigkeit von etwa 70proz. Alkoholgehalt entstand.

Nach dem Abfiltrieren des hierbei ausgefallenen Calcium-Magnesiumsalzes der Pektinsäure ergab die im Vakuum zur Trockne verdampfte alkoholische Lösung einen braun gefärbten Rückstand. Diese Masse wurde hintereinander mit 90-, 85- und 83proz. Alkohol auf dem Wasserbad und mit Rückflußkühler ausgekocht.

Durch die letzte Auskochung (mit 83proz. Alkohol) ließ sich ein Araban erzielen, das ein spezifisches Drehungsvermögen von $[\alpha]_D = -164{,}2^\circ$, einen nur geringen Aschengehalt und ebenfalls eine nur schwache Reduktionsfähigkeit besaß. Eine Furfurolsalzsäuredestillation ergab mit 0,2250 g dieser Substanz (im Vakuum bei 78° getrocknet) 0,1803 g Phloroglucid. Dem entspricht 0,2042 g Arabinose oder *90,7 Proz. Arabinose* in dem untersuchten Araban.

Der bei den obigen alkoholischen Auskochungen unlösliche Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und die Flüssigkeit in Alkohol eingetragen. Es fiel ein graubrauner, voluminöser Niederschlag, der, abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 109° getrocknet, ein spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -101{,}5^\circ$ zeigte. Die Substanz war aschenhaltig und reduzierte schwach *Fehling*sche Lösung.

Um ein möglichst aschenarmes Araban zu erhalten, wurde die letztere Substanz in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit etwas verdünnter Oxalsäure versetzt und nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen Calciumoxalats in Alkohol eingetropft. Das in gelbbraunen Flocken ausgefallene Araban wurde abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum bei 78° getrocknet. Die Substanz zeigte eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D = -70{,}9^\circ$ und besaß nur geringes Reduktionsvermögen.

Elementaranalyse des vakuumtrockenen Arabans:

0,1825 g Substanz: 0,2847 g CO_2, 0,0912 g H_2O, 0,0041 g Asche.

Nach Abzug der Asche (2,25 Proz.) berechnet sich:

für $2\,C_5H_{10}O_5 - 2\,H_2O$.	Ber.:	C 45,45	H 6,06	O 48,49
	Gef.:	C 43,53	H 5,72	O 50,75
für $2\,C_5H_{10}O_5 - H_2O$.	Ber.:	C 42,55	H 6,38	O 51,07

Die obenstehenden Untersuchungen lassen erkennen, wie schwierig es ist, aus dem Roharaban einen einheitlichen Körper zu isolieren. Die

Analysenwerte der bei den verschiedenen Trennungsverfahren erhaltenen Präparate zeigten wechselnde Übereinstimmung mit den Formeln:

$$2\,C_5H_{10}O_5 - 2\,H_2O,$$
$$2\,C_5H_{10}O_5 - H_2O,$$
$$3\,C_5H_{10}O_5 - 2\,H_2O,$$

oder aber es wurden dazwischen liegende Zahlenwerte gefunden, so daß man sich ein Gemisch dieser Anhydride vorstellen könnte.

Die verschiedenen erhaltenen Arabanpräparate zeigten ein sehr wechselndes Verhalten gegenüber *Fehling*scher Lösung. Teils reduzierten sie diese nur sehr schwach, teils wieder stärker. Die am höchsten drehenden Arabane reduzierten *Fehling*sche Lösung gewöhnlich nur sehr wenig, während die Arabane mit niedrigerer Drehung viel mehr Kupferoxydul aus der heißen alkalischen Kupferlösung abschieden.

Die Reduktionszahl steigt offenbar zumeist in dem Maße, wie das Arabanmolekül Hydrolyse durch die stets nebenher vorhandene Säure erfahren hat. Der Löslichkeit des Calcium-, Barium- und Bleisalzes entsprechend, die in den vorstehenden Versuchen die Arabansubstanz häufig verunreinigten, ist anzunehmen, daß diese Säure hauptsächlich die Essigsäure ist neben Spuren von Pektinsäure oder daraus abgespaltener Galakturonsäure oder von Saponinsubstanzen, die ebenfalls in die alkoholischen Extrakte des Hydropektins mit übergegangen waren. Dadurch, daß mehr oder minder große Mengen von Säuren auf das ursprüngliche Araban einwirken, werden die maskierten Aldehydbindungen der Arabinosegruppen gesprengt und unter Umständen rechtsdrehende Arabinose selbst frei. Hierdurch wird ohne weiteres die Zunahme der Reduktion wie die Abnahme der Linksdrehung der betreffenden isolierten Arabane oder Arabangemische verständlich, ebenso wie die Zunahme ihrer Löslichkeit in Alkohol und ihrer hygroskopischen Eigenschaften.

VI. Bestimmung der Essigsäure im Araban.

Es wurde versucht, nachzuweisen, daß das Roharaban stets durch Essigsäure und ihre Salze verunreinigt ist, die durch Einwirkung des heißen Wassers auf das Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure während der Auskochung des Rübenmaterials und beim weiteren Eindampfen der Extrakte entstehen.

Zu diesem Zwecke wurde eine wässerige Lösung von 3,13 g Roharaban aus Hydropektin von Rübenschnitzeln zunächst direkt mit Wasserdampf destilliert. 1 Liter des übergehenden Destillats verbrauchte zur Neutralisation gegen Phenolphthalein 2,4 ccm n/10 Natronlauge. Nunmehr wurde die zurückbleibende Lösung mit so viel verdünnter Schwefelsäure versetzt, daß eine etwa 1 proz. schwefelsaure Lösung entstand, und mit Wasserdampf weiter destilliert.

Das	2. Liter	Destillat	neutralisierte	8,5 ccm	n/10 NaOH
„	3. „	„	„	4,8 „	n/10 NaOH
„	4. „	„	„	1,7 „	n/10 NaOH

Der Gesamtverbrauch von 17,4 ccm n/10 Natronlauge entspricht einer Menge von 0,1044 g Essigsäure oder *3,3 Proz. Essigsäure* in dem Araban.

Näheres über genauere Essigsäurebestimmungen, bei denen auch die in geringer Menge vorhandene Ameisensäure mit berücksichtigt wurde, siehe im Kapitel über die Essigsäurebestimmung in der Pektinsäure (S. 304, 305, 311, 312 u. 320).

VII. Versuche zur Acetylierung und Benzoylierung von Araban.

Acetylierung. 1 g Araban aus Hydropektin von Rübenschnitzeln mit der spezifischen Drehung von $[\alpha]_D = -142,4^0$ wurde in einem kleinen Kölbchen mit 10 ccm Essigsäureanhydrid übergossen und nach Zugabe von einem Körnchen Chlorzink auf dem Drahtnetz bei kleiner Flamme gekocht. Nach einer halben Minute wurde das Araban sirupartig und nach 2 bis 3 Minuten war alles mit brauner Farbe in Lösung gegangen. Die Flüssigkeit wurde nach dem Abkühlen in kaltes Wasser gegossen, wobei sich das acetylierte Produkt erst sirupförmig abschied, nach einigem Stehen aber fest wurde. Dieser Körper wurde nach dem Abfiltrieren im Mörser mit Wasser zur Entfernung der sauren Reaktion verrieben und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Die gelbbraune, pulverförmige Substanz (0,9 g) war in Alkohol, Chloroform, Pyridin und Essigester in der Hitze löslich, unlöslich in Wasser, Äther, Petroläther und Benzol.

Es wurde eine Umfällung des Körpers vorgenommen durch Lösen in Chloroform, Entfärben mit Tierkohle, Filtrieren und Versetzen mit wenig Äther. Der teils flockig, teils sirupös ausfallende Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, wobei wieder eine hart werdende, pulverige Masse erhalten wurde.

0,1169 g dieser getrockneten Substanz wurden in einem kleinen Kölbchen in 20 ccm Alkohol suspendiert und 20 ccm n/10 Natronlauge zugegeben. Nach 24 Stunden langem Stehen im gut verschlossenen Kölbchen wurde mit 10,2 ccm n/10 Schwefelsäure zurücktitriert.

Verbrauch: 9,8 ccm n/10 Natronlauge, entsprechend 0,0421 g Acetyl.

Demnach im acetylierten Araban: *38,0 Proz. Acetyl.*

Für ein Diacetyl-monoanhydro-araban entsprechend der Formel $[(C_5H_8O_5 - H_2O) . (CH_3CO)_2]_x$ würde sich ein Gehalt von *39,8 Proz. Acetyl* berechnen.

Leider reichte die geringe Menge Substanz für weitere Untersuchungen zur Bestätigung dieser Formel nicht aus, insbesondere, ob es sich um ein bi- oder trimolekulares Polymeres handelte.

Benzoylierung. Bei der Benzoylierung des Arabans mit Benzoylchlorid und Natronlauge gelangte man nur zu halbfesten, meist gummiartigen Produkten, die nicht weiter untersucht wurden.

VIII. Versuche zur Bestimmung des Molekelgewichts des Arabans.

1. 0,3457 g im Vakuum getrocknetes, schwach reduzierendes Araban ($[\alpha]_D = -150,2^0$) wurden in 10,0 g Wasser gelöst.

Gefrierpunktserniedrigung $\Delta_t = 0,150^0$.

Molekelgewicht = 428.

2. 0,1960 g vakuumtrockenes, wenig reduzierendes Araban ($[\alpha]_D = -149,4^0$) wurden in 10,0 g Wasser gelöst.

Gefrierpunktserniedrigung $\Delta_t = 0,072^0$.

Molekelgewicht = 352.

Berechnetes Molekelgewicht für

$$2\,C_5H_{10}O_5 - 2\,H_2O = 264$$
$$3\,C_5H_{10}O_5 - 3\,H_2O = 396$$
$$4\,C_5H_{10}O_5 - 4\,H_2O = 528$$
$$2\,C_5H_{10}O_5 - H_2O = 282$$
$$3\,C_5H_{10}O_5 - 2\,H_2O = 414$$

Aus den beobachteten Molekelgewichten wäre mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu folgern, daß das Arabanmolekül in den vorliegenden Fällen nur aus einem Komplex von zwei oder drei Arabinoseanhydriden besteht.

IX. Hydrolyse des Arabans mit Schwefelsäure.

a) Gewinnung von kristallisierter Arabinose.

Im folgenden wurden Untersuchungen angestellt, Roharaban durch Säurehydrolyse zu spalten und die dabei frei werdende Arabinose zu gewinnen und näher zu identifizieren. Außer diesem war kein anderes Kohlenhydrat im Araban nachweisbar.

5 g im Vakuum bei 78° getrocknetes Roharaban aus Hydropektin von Rübenschnitzeln wurden in 300 ccm 1proz. Schwefelsäure gelöst.

Drehung dieser Lösung im 1-dm-Rohr $a_D = -1{,}74^0 = -5{,}0^0$ Saccharose. $c = 1{,}66$.

$$[a]_D = -104{,}8^0.$$

Die Flüssigkeit wurde zuerst auf dem Wasserbade am Rückflußkühler erhitzt, dann über freier Flamme gekocht.

Drehung nach:

1 Minute	langem	Erhitzen	$a_D = -5{,}0^0$	Saccharose	$l = 1$
2 Minuten	„	„	$a_D = -5{,}0$	„	$l = 1$
3 „	„	„	$a_D = -3{,}5$	„	$l = 1$
10 „	„	Kochen	$a_D = +3{,}2$	„	$l = 1$

Drehung nach weiteren

30 Minuten	langem	Kochen	$a_D = +4{,}5$	„	$l = 1$
20 „	„	„	$a_D = +4{,}7$	„	$l = 1$
10 „	„	„	$a_D = +4{,}7$	„	$l = 1$

Da $[a]_D = \frac{a \, . \, 100}{l \, . \, c}$, wurde für $[a]_D$ die spezifische Drehung der Arabinose $+ 104{,}5^0$ eingesetzt, so daß man aus dieser Gleichung schon direkt die Menge der Arabinose in der obigen Lösung berechnen konnte. $c = 1{,}56$, also in der Lösung 4,68 g Arabinose aus 5 g Araban. Das entspricht einer Ausbeute von *93,6 Proz. Arabinose* aus Araban.

Die Lösung wurde mit Bariumcarbonat unter Erhitzen auf dem Wasserbad neutralisiert, mit Tierkohle entfärbt, filtriert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Der gelbgefärbte Rückstand wurde erschöpfend mit 85proz. Alkohol ausgekocht und die alkoholischen Lösungen zum Sirup eingedampft, aus dem in kurzer Zeit Arabinose auskristallisierte. Die Kristallmasse wurde mit 90proz. Alkohol verrieben, abgesaugt, mit Alkohol und Äther nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

Das Filtrat der Arabinose wurde wieder zum Sirup eingedampft, aus dem nach einigem Stehen eine zweite Kristallisation erfolgte. Auch diese Arabinose wurde abfiltriert und wie oben gewaschen und getrocknet.

Gesamtgewicht der erhaltenen vakuumtrockenen Arabinosekristalle: *4,54 g*, dem entspricht eine *Ausbeute von 90,8 Proz. Arabinose* auf Araban berechnet.

Das Endfiltrat wurde zum Sirup eingedampft und mit Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,15 zur Prüfung auf Galaktose oxydiert. Schleimsäure war jedoch nicht nachzuweisen.

Die erhaltene Arabinose wurde noch einmal aus Alkohol umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1841 g der vakuumtrockenen Arabinose wurden in 10 ccm Wasser gelöst. $c = 1{,}84$.

Enddrehung der Lösung im 2-dm-Rohr (nach 8 Stunden): $a_D = + 3{,}82^\circ$.

$$[a]_D = + 103{,}8^\circ.$$

Elementaranalyse: 0,1763 g Substanz: 0,2560 g CO_2, 0,1041 g H_2O.

$C_5H_{10}O_5$.			
Ber.:	C 39,98	H 6,67	O 53,35
Gef.:	C 39,60	H 6,61	O 53,79

b) Darstellung von l-Arabinose-Benzylphenylhydrazon.

Roharaban aus Hydropektin von Rübenschnitzeln wurde, wie bei dem vorigen Versuch beschrieben, mit 1proz. Schwefelsäure erhitzt, bis die Drehung der Lösung konstant geworden war. Dann wurde die Flüssigkeit unter Erhitzen auf dem Wasserbad mit Bariumcarbonat neutralisiert, nach dem Filtrieren im Vakuum zur Trockne verdampft und der gelbbraune sirupöse Rückstand mit 85proz. Alkohol ausgekocht.

Bei der Auskochung mit Alkohol hinterblieb ein Rückstand, der in Wasser gelöst und durch Eintragen in Alkohol wieder ausgefällt wurde. Diese Substanz war bariumhaltig und gab stark die Naphthoresorcinreaktion. Es war das Bariumsalz einer Aldehydcarbonsäure, die in geringen Mengen aus der Pektinsäure und wohl auch aus dem Saponin herstammend als verunreinigender Bestandteil dem Roharaban beigemischt ist.

Die alkoholischen Auskochungen wurden nun zum Sirup eingedampft, der nach einigem Stehen kristallinisch erstarrte. 4,9 g dieser Kristallmasse wurden in einem Becherglase in 70 ccm 75proz. Alkohol gelöst und dazu 7 g Benzylphenylhydrazin zugegeben. Nach 3 Minuten langem Erwärmen der entstandenen Lösung auf dem Wasserbad begann die Ausscheidung des Hydrazons in gelblichen Flocken. Nachdem das Ganze noch 2 Minuten erwärmt und dann abgekühlt wurde, schied sich das Hydrazon sehr bald in großen Mengen aus, die den ganzen Raum des Becherglases breiartig erfüllten. Schließlich wurde das gelb gefärbte Hydrazon abgesaugt, mit 75- und 96proz. Alkohol, dann mit Äther nachgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die schon schneeweiß aussehende Substanz (5,15 g) wurde aus 75proz. Alkohol umkristallisiert und zeigte, im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet, den Schmelzpunkt des l-Arabinose-Benzylphenylhydrazons *173 bis 174*°, während *Ruff* und *Ollendorf*[1]) 174° gefunden haben.

Das Hydrazon zeigte in methylalkoholischer Lösung die spezifische Drehung $[a]_D = -12{,}3^\circ$. *Browne* und *Tollens*[2]) fanden $[a]_D = -12{,}1^\circ$.

Stickstoffbestimmung: 0,2876 g vakuumtrockene Substanz, 21,9 ccm Stickstoff, Temperatur = 20°, $b = 752$ mm.

Für $C_{18}H_{22}O_4N_2$.	Ber.:	8,48 Proz.	N
	Gef.:	8,60 ,,	N

Das alkoholische Filtrat des Hydrazons wurde mit Wasser versetzt zur Ausfällung von weiterem Hydrazon. Aus der erst nur getrübten Lösung

[1]) Ber. 32, 3224, 1900.
[2]) Ber. 35, 1461, 1902.

schied sich nach längerem Stehen ein Körper in flockiger Form ab. Es wurde abfiltriert, wie oben gewaschen und getrocknet (1,84 g). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol zeigte er den Schmelzpunkt 170 bis 171° und nach nochmaligem Umkristallisieren schmolz er bei 173° und erwies sich ebenfalls als Arabinose-Benzylphenylhydrazon, von dem in ganzen 6,99 *g* in reiner Form gewonnen wurden.

c) Darstellung von l-Arabinose-α-Methylphenylhydrazon.

0,5 g aus der Hydrolyse des Roharabans erhaltene Arabinose wurde in 3 ccm Wasser gelöst und 0,4 g α-Methylphenylhydrazin, in Alkohol gelöst, zugegeben. Nach kurzer Zeit trübte sich die Lösung und die Kristallisation begann. Nach 3 Stunden wurden die Kristalle abgesaugt, zweimal aus heißem Wasser und einmal aus 30proz. Alkohol umkristallisiert.

Das schneeweiß aussehende l-Arabinose-α-Methylphenylhydrazon zeigte den *Schmelzpunkt 164°*. *Müther* und *Tollens*[1]) fanden ebenfalls dafür 164°.

Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure.

Um den zweiten Bestandteil des Hydropektins, das Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure, in größeren Mengen zu gewinnen, wurden die wie beschrieben erhaltenen gelb bis braun gefärbten, harten gelatineartigen Blättchen des Hydropektins aus Rübenschnitzeln zunächst im Mörser zu grobkörnigem Pulver zerrieben, um die nachfolgende Auslaugung mit 70proz. Alkohol noch wirksamer zu gestalten.

Diese Auslaugung wurde in der Kälte und unter Erhitzen auf dem Wasserbade in einem Rundkolben mit aufgesetztem Rückflußkühler unter wiederholtem Ersatz des angewandten Alkohols vorgenommen. Als das Lösungsmittel bei dem Auskochen fast farblos blieb und keine Drehung mehr zeigte, wurde das rohe Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure abfiltriert, mit Alkohol und Äther nachgewaschen und bei 110° getrocknet.

15 g dieses grau aussehenden Salzes wurden in 500 ccm Wasser gelöst und diese trübe, etwas dickflüssige Lösung mit Kieselgur filtriert, was nur sehr langsam vonstatten ging. Das Filtrat von gelblicher Farbe wurde in 2 Liter Alkohol eingetropft, wobei sich das Calcium-Magnesiumsalz in weißlich bis gelblich gefärbten, gallertartigen Flocken absetzte. Es wurde abfiltriert und in Alkohol suspendiert, um dem Niederschlag das beim Ausfällen mit eingeschlossene Wasser zu entziehen. Dieser Wasserentzug machte sich durch Schrumpfen der zuerst stark voluminös ausgefallenen Substanz bemerkbar. Nach 3 Tage langem Stehen unter Alkohol wurde das Salz abfiltriert und in Äther eingetragen, wo es sich vollends zusammenballte und pulverförmig wurde. Nach weiteren 2 Tagen Stehen unter Äther wurde die Substanz abgesaugt, noch einmal mit Äther nachgewaschen, im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrocknet und schließlich als ein schwach graues Pulver im Gewichte von 11 g erhalten.

0,2088 g trockener Substanz wurden in 20 ccm Wasser gelöst. $c = 1,04$.

Drehung im 1-dm-Rohr $\alpha_D = + 1,28^\circ$.

$$[\alpha]_D = + 124,5^\circ.$$

[1]) *Müther* und *Tollens*, Ber. 37, 312, 1904.

Die Lösung verhielt sich praktisch neutral. Das Calcium-Magnesiumsalz wurde noch einmal umgefällt, indem es in 400 ccm Wasser gelöst und die Flüssigkeit in 2 Liter Alkohol eingetropft wurde. Der gallertartig in Flocken ausfallende Niederschlag wurde wie oben abfiltriert, in Alkohol, dann in Äther suspendiert und im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1897 g des vakuumtrockenen Salzes wurden in 10 ccm Wasser gelöst. $c = 1{,}9$. Drehung im 0,5-dm-Rohr $\alpha_D = +\,1{,}25°$.

$$[\alpha]_D = +\,131{,}6°.$$

Die Substanz wurde dann noch ein drittes Mal aus wässeriger Lösung mit Alkohol umgefällt und auf die oben beschriebene Weise getrocknet.

0,1827 g des jetzt rein weißen vakuumtrockenen Salzes wurden in 10 ccm Wasser gelöst. $c = 1{,}83$. Drehung im 1-dm-Rohr: $\alpha_D = +\,2{,}36°$.

$$[\alpha]_D = +\,129°.$$

Elementaranalyse der vakuumtrockenen Substanz:

1. 0,2054 g Substanz: 0,3121 g CO_2, 0,1024 g H_2O, 0,0085 g Asche (Rückstand im Schiffchen).

2. 0,1204 g Substanz: 0,1810 g CO_2, 0,0583 g H_2O, 0,0052 g Asche (Rückstand im Schiffchen).

Gef.:	1.	C 43,23	H 5,82	O 50,95
	2.	C 42,85	H 5,66	O 51,49

auf aschenfreie Substanz bezogen (1. 4,4 Proz. Asche, 2. 4,3 Proz. Asche).

Methoxylbestimmung nach *Zeisel-Fanto-Stritar*:

1. 0,3958 g vakuumtrockener Substanz liefern 0,1945 g Ag J entsprechend *6,44 Proz. Methoxyl.*

2. 0,2176 g vakuumtrockener Substanz liefern 0,1096 g Ag J entsprechend *6,80 Proz. Methoxyl.*

Aschenanalyse: 1,2712 g im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrocknetes Calcium-Magnesiumsalz wurden im Platintiegel verascht und unter Zusatz von Ammoniumcarbonat geglüht. Die Carbonatasche wog 0,0734 g, entsprechend 5,7 Proz. auf Calcium-Magnesiumsalz bezogen.

Eine genauere Analyse der Carbonatasche ergab:

	angewandt:	0,0734 g Asche	
	besteht aus:	0,0034 g SiO_2	= 4,6 Proz.
		0,0027 g $Fe_2O_3 + Al_2O_3$	= 3,6 „
0 0391 g $Mg_2P_2O_7$	oder	0,0296 g $MgCO_3$	= 40,3 „
0,0241 g CaO	oder	0,0430 g $CaCO_3$	= 58,6 „
			107,1 Proz.

Die Hauptmenge der Asche des Salzes setzt sich also aus Calcium und Magnesium zusammen, während die geringen Mengen von Kieselsäure und Eisen bzw. Aluminiumoxyd offenbar von Verunreinigungen herrühren.

Essigsäure als Bestandteil des Hydropektins und des Calcium-Magnesiumsalzes der Pektinsäure.

Essigsäure im Hydropektin.

Als bisher übersehener Bestandteil des Pektins der Rübe wurde *Essigsäure* ermittelt. Um einen Überblick über ihre Mengen darin zu erhalten, wurde zunächst im Hydropektin, später im Salz der Pektinsäure und besonders in der freien Pektinsäure selbst, in deren Molekül die Acetylgruppen verankert sind, Bestimmungen der Essigsäure vorgenommen.

10 g im Vakuum bei 100° getrocknetes Hydropektin aus Rübenschnitzeln wurden in einem Rundkolben in 500 ccm Wasser gelöst und die Lösung in üblicher Weise mit Wasserdampf destilliert. Die Destillate wurden mit n/10 Natronlauge gegen Phenolphthalein titriert.

1.	Liter	Destillat	neutralisiert	3,4 ccm	n/10 Natronlauge
2.	"	"	"	5,0 "	"
3.	"	"	"	5,2 "	"
4.	"	"	"	5,6 "	"
5.	"	"	"	4,0 "	"

Dann wurde die Hydropektinlösung mit 10 ccm verdünnter Schwefelsäure versetzt bis zur schwach sauren Reaktion gegen Kongo und mit Wasserdampf weiter destilliert.

6.	Liter	Destillat	neutralisiert	8,4 ccm	n/10 Natronlauge
6.	"	"	"	14,0 "	"
8.	"	"	"	13,3 "	"
9.	"	"	"	10,6 "	"
10.	"	"	"	8,7 "	"

Nun wurde zu der Hydropektinlösung so viel verdünnte Schwefelsäure zugegeben, daß eine etwa 1 proz. schwefelsaure Lösung entstand.

Diese Flüssigkeit wurde weiter mit Wasserdampf destilliert und die Destillate mit n/10 Natronlauge gegen Phenolphthalein titriert.

11.	Liter	Destillat	neutralisiert	17,4 ccm	n/10 NaOH
12.	"	"	"	16,5 "	"
13.	"	"	"	7,9 "	"
14.	"	"	"	6,7 "	"
15.	"	"	"	7,4 "	"
16.	"	"	"	3,0 "	"
17.	"	"	"	3,8 "	"
18.	"	"	"	2,9 "	"

Die Destillate verbrauchten zusammen (18 Liter) zur Neutralisation 143,8 ccm n/10 Natronlauge. Da 1000 ccm n/10 Natronlauge 6,0 g Essigsäure neutralisieren, entsprach der Verbrauch von 143,8 ccm n/10 Natronlauge einer Menge von 0,863 g Essigsäure.

Also enthält das *Hydropektin 8,6 Proz. Essigsäure.*

Wie später gezeigt wird, geht mit der Essigsäure stets etwas Ameisensäure mit über, die aus Zersetzungen der Kohlenhydrate durch die kochende Säurelösung entstanden ist. Der hierdurch bedingte Fehler ist auf etwa 8 bis 10 Proz. zu veranschlagen. Dieser Prozentsatz wäre also von dem obigen Essigsäuregehalt abzuziehen.

Essigsäure im Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure.

10 g Hydropektin aus Rübenschnitzeln wurden mit 70proz. Alkohol in der Kälte und unter Erhitzen auf dem Wasserbade am Rückflußkühler erschöpfend ausgelaugt. Das unlösliche Calcium-Magnesiumsalz wurde abfiltriert, mit Alkohol und Äther nachgewaschen und bei 110° getrocknet. Es wog 6,87 g.

Die alkoholische Lösung enthielt also 3,13 g Araban in trockenem Zustande. In diesem Araban wurde, wie früher gezeigt (S. 297), nur 3,3 Proz. Essigsäure gefunden.

Das bei der alkoholischen Auslaugung des Hydropektins unlösliche Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure (6,87 g) wurde in 500 ccm Wasser gelöst, die Lösung, wie früher beschrieben, mit Wasserdampf destilliert und die Destillate mit n/10 Natronlauge titriert.

1. Liter	Destillat	neutralisiert	1,8 ccm	n/10 Natronlauge
2. „	„	„	1,0 „	„

Die Lösung des Calcium-Magnesiumsalzes wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert bis zur schwach sauren Reaktion gegen Kongopapier und mit Wasserdampf weiter destilliert.

1. Liter	Destillat	neutralisiert	10,2 ccm	n/10 Natronlauge
2. „	„	„	16,5 „	„
3. „	„	„	20,0 „	„
4. „	„	„	12,8 „	„
5. „	„	„	10,8 „	„
6. „	„	„	6,2 „	„
7. „	„	„	5,6 „	„
8. „	„	„	3,3 „	„
9. „	„	„	3,3 „	„

Zu der Lösung wurde jetzt so viel verdünnte Schwefelsäure zugegeben, daß eine etwa 1proz. schwefelsaure Lösung entstand. Diese Flüssigkeit wurde mit Wasserdampf weiter destilliert.

10. Liter	Destillat	neutralisiert	2,3 ccm	n/10 Natronlauge
11. „	„	„	3,2 „	„
12. „	„	„	2,6 „	„
13. „	„	„	1,9 „	„

Der Gesamtverbrauch von 101,5 ccm n/10 Natronlauge entspricht einer Menge von 0,61 g Esigsäure, woraus sich für das *Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure der Gehalt an Essigsäure zu 8,89 Proz.* berechnen läßt.

Bei diesem Ergebnis war jedoch die durch Zersetzung der Kohlenhydrate entstandene Ameisensäure mitgerechnet worden. Um diesen Fehler zu korrigieren, wurden die gesamten neutralisierten Destillate auf ein Volumen von 200 ccm eingeengt. In der Hälfte der Lösung wurde nach der Methode von *Porter* und *Ruyssen*[1]) die Ameisensäure bestimmt, indem sie mit 5 g Quecksilberchlorid und 2,75 g Natriumacetat 6 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt wurde. Nach der Gleichung

$$2\,HgCl_2 + HCOOH = Hg_2Cl_2 + CO_2 + 2\,HCl$$

[1]) Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. 2, 22, 1910.

reduziert die vorhandene Ameisensäure das Quecksilberchlorid zu Chlorür, welches abfiltriert, getrocknet und gewogen wurde.

Es wurden 0,2352 g Hg_2Cl_2 erhalten.

1 g Hg_2Cl_2 entspricht 0,0976 g Ameisensäure.

0,2352 g Hg_2Cl_2 entspricht 0,023 g Ameisensäure.

In den gesamten Destillaten waren also 0,046 g *Ameisensäure* enthalten.

4,6 g Ameisensäure neutralisieren 1000 ccm n/10 NaOH.

0,046 g „ „ 10,0 „ n/10 NaOH

Gesamtverbrauch für die vorhandene Essigsäure: 101,5—10,0 = 91,5 ccm n/10 NaOH, dem entspricht 0,549 g Essigsäure.

Der *genaue Gehalt an Essigsäure* beträgt also im *Calcium-Magnesiumsalz 8,0 Proz.*

Aus der Gegenüberstellung scheint zu folgern, daß die Acetylgruppen sich allein in der Pektinsäure vorfinden. Die im Araban in freier Form und in Form der Salze nachgewiesene Essigsäure (s. S. 297) ist als verunreinigende Beimengung anzusehen, die sich ebenfalls aus der Pektinsäure durch hydrolytische Prozesse während der Darstellung gebildet hat. Der wahre Gehalt der Pektinsäure an Essigsäure dürfte daher noch höher zu veranschlagen sein.

Zusammensetzung der Pektinsäure aus Rübenschnitzeln nach verschiedenen Darstellungsverfahren.

Pektinsäure (Präparat 1).

24,6 g rohes Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure wurden in 900 ccm Wasser unter schwachem Erwärmen auf dem Wasserbade zu einer trüben, braunen, schwer filtrierbaren Lösung gelöst. Nach Zusatz von 100 ccm konzentrierter Salzsäure zu der erkalteten Flüssigkeit hellte sich die Lösung etwas auf und wurde dünnflüssiger. Sie ließ sich nunmehr über Kieselgur filtrieren. Das Filtrat wurde in 3 Liter Alkohol eingetropft, wobei sich die Pektinsäure in gallertartigen Flocken abschied. Der Niederschlag wurde auf großen porösen Saftfiltern abfiltriert (wobei sich das Filtrat noch als optisch aktiv erwies, und zwar zeigte es im 2-dm-Rohr $\alpha_D = + 0,3^0$ Saccharose) und in Alkohol suspendiert. Nach längerem Stehen filtrierte man ab und suspendierte die Pektinsäure noch einmal in Alkohol. Nach 3 Tagen wurde die körniger gewordene Substanz abgesaugt, in Äther einige Zeit suspendiert, wiederum scharf abgenutscht und im Mörser so lange verrieben, bis der Äther verdunstet und die Substanz zu einem weißen Pulver eingetrocknet war. Bei 105^0 getrocknet, ergab sich eine Ausbeute von 11,95 g Pektinsäure.

0,2604 g der trockenen Pektinsäure zeigten in 10 ccm Wasser gelöst im 1-dm-Rohr eine Drehung von $\alpha_D = + 5,34^0$. Die spezifische Drehung beträgt also $[\alpha]_D = + 205,5^0$.

0,1302 g Substanz in Wasser gelöst verbrauchten zur Neutralisation gegen Phenolphthalein als Indikator 2,15 ccm n/10 Natronlauge.

1 g Pektinsäure neutralisiert demnach 16,5 ccm n/10 NaOH.

Bei der Veraschung auf dem Platinspatel gab die Pektinsäure einen geringen Rückstand, der, in Wasser gelöst, alkalisch reagierte und sich als Calcium erwies.

Die so erhaltene Pektinsäure (11,3 g) wurde zur weiteren Reinigung in 300 ccm Wasser gelöst, filtriert und die Flüssigkeit in 1200 ccm Alkohol eingetropft. Die ausgefallene Pektinsäure wurde abfiltriert, zweimal in Alkohol, dann in Äther suspendiert und schließlich abgesaugt und im Mörser zu einem weißen Pulver verrieben. Bei 110° getrocknet, wog die Pektinsäure 9,8 g.

0,2015 g der getrockneten Säure wurden in 10 ccm Wasser gelöst. Drehung im 1-dm-Rohr $\alpha_D = + 4{,}37^0$.

$$[\alpha]_D = + 216{,}9^0.$$

0,1007 g Substanz neutralisierten 1,65 ccm n/10 NaOH. 1 g Pektinsäure verbrauchten demnach zur Neutralisation 16,4 ccm n/10 Natronlauge.

Die 4 Stunden bei 100° im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknete Pektinsäure lieferte bei der *Elementaranalyse* folgende Werte:

1. 0,2189 g Substanz: 0,3454 g CO_2, 0,1051 g H_2O, 0,0012 g Asche (= 0,55 Proz.).

2. 0,1551 g Substanz: 0,2458 g CO_2, 0,0709 g H_2O, 0,0008 g Asche (= 0,52 Proz.).

Hiernach wurde gefunden nach Abzug der Asche:

C 43,27	H 5,40	O 51,33
C 43,44	H 5,14	O 51,42

Methoxylbestimmung nach *Zeisel-Fanto-Stritar*:

0,2521 g im Vakuum bei 100° getrocknete Pektinsäure liefern 0,1313 g AgJ, dem entsprechen *6,9 Proz. Methoxyl in der Pektinsäure.*

Furfurolbestimmung. 0,2530 g im Vakuum bei 100° getrockneter Pektinsäure wurden der Furfurolsalzsäuredestillation nach *Kröber* und *Tollens*[1]) unterworfen.

Das erhaltene Furfurol-Phloroglucid wog 0,0793 g.

Bei dem Auslaugen des Phloroglucids mit 96proz. Alkohol bei 60° gingen 6,6 Proz. des Niederschlages in die alkoholische Lösung, was auf die Anwesenheit von Methylfurfurolphloroglucid[2]) hindeutete. Der Nachweis von Methylpentosen nach *Rosenthaler*[3]) — charakteristische Rotfärbung beim Erhitzen mit Aceton und Salzsäure — fiel aber sowohl bei der Pektinsäure als auch, wie später gezeigt wird (S. 317) in dem bei der Pektinsäurespaltung erhaltenen Zuckersirup negativ aus. Es ist demnach anzunehmen, daß der alkohollösliche Bestandteil des oben erhaltenen Furfurol-Phloroglucids als ein Zersetzungsprodukt der nebenher in der Pektinsäure vorhandenen Galakturonsäure auftritt.

Die erhaltene Menge Phloroglucid 0,0793 g entspricht 0,0933 g Arabinose, und es würde sich demnach ein Gehalt von 36,88 Proz. Arabinose in der Pektinsäure berechnen. Wie später gezeigt wird (S. 316), ist der tatsächliche Gehalt an Arabinose viel geringer, da der größte Teil des bei der Salzsäuredestillation entstehenden Furfurols aus der in der Pektinsäure vorhandenen Galakturonsäure herstammt.

---

[1]) *Tollens*, Handb. d. Kohlenhydrate 1914, S. 136.

[2]) *Votoček*, Ber. 30, 1195, 1897.

[3]) Ann. d. Chem. 48, 167, 1909.

Spaltung der Pektinsäure mit Salzsäure zu Digalakturonsäuren.

7,13 g im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrockneter Pektinsäure wurden in 200 ccm 2proz. Salzsäure gelöst und die schwach gelb gefärbte Lösung auf dem Wasserbad erhitzt. Nach etwa 1½ Stunden trübte sich die Lösung und es fiel ein feiner farbloser Niederschlag aus. Nach achtstündigem Erhitzen, als sich die Menge des Niederschlags nicht mehr vermehrte, wurde die Flüssigkeit zum Absitzen des Niederschlages 12 Stunden stehengelassen und dann abfiltriert. Auf dem Filter wurde dieser mit Wasser nachgewaschen zur Entfernung der Salzsäure und dann mit kochendem Alkohol zur Befreiung von Spuren verunreinigender Saponinsubstanzen und Farbstoffe. Der Niederschlag wurde nunmehr an der Luft ausgebreitet liegengelassen zur Verdunstung des Alkohols und darauf in kochendem Wasser bei Zusatz von wenigen Tropfen Ammoniak vollkommen gelöst. Die heiße Lösung wurde klar filtriert und das abgekühlte Filtrat mit einem Überschuß von Salzsäure versetzt, wobei die *Digalakturonsäure a* als schneeweißer Niederschlag ausfiel, der abfiltriert, in Alkohol, dann in Äther suspendiert und im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrocknet wurde. Ausbeute *2,8 g Digalakturonsäure a* entsprechend *39,3 Proz. auf Pektinsäure* berechnet.

Die so erhaltene Digalakturonsäure gibt die Orcin- und Naphthoresorcinreaktion sehr deutlich. Sie ist in kaltem Wasser schwer löslich, in Salzsäure unlöslich und gibt mit Metallsalzen und Erdalkalien flockige, zum Teil gallertartige Niederschläge. Die Verbindung stimmt in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften und in ihrer Zusammensetzung im wesentlichen mit der Digalakturonsäure a überein, die früher durch Hydrolyse von Hydropektin mittels 5proz. Salzsäure erhalten war, unterscheidet sich aber hiervon der Elementaranalyse zufolge durch einen Mehrgehalt von 1 Mol. Wasser, so daß der vorliegenden Substanz die Formel eines *Hydrats der Digalakturonsäure a* $C_{12}H_{16}O_{12} . H_2O$ zuzusprechen ist.

Elementaranalyse des im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrockneten *Hydrats der Digalakturonsäure a.*

0,1946 g Substanz liefern 0,2781 g CO_2, 0,0782 g H_2O, 0,0006 g Asche.

Auf aschenfreie Substanz bezogen (0,1940 g):

$C_{12}H_{16}O_{12} . H_2O$.	Ber.:	C 38,92	H 4,86	O 56,22
	Gef.:	C 39,10	H 4,51	O 56,39

Die Säure wurde zur Reinigung noch einmal in kochendem Wasser gelöst und die filtrierte Lösung nach dem Erkalten mit einem Überschuß von Salzsäure versetzt. Die ausfallenden farblosen Flocken wurden abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther, wie oben beschrieben, gewaschen und im Vakuum bei 100° getrocknet.

Die Elementaranalyse der umgefällten Säure lieferte dieselben Werte wie die zuerst erhaltene Säure.

0,1116 g Substanz (vakuumtrocken): 0,1590 g CO_2, 0,0458 g H_2O, 0,0004 g Asche. Auf aschenfreie Substanz bezogen (0,1112 g):

$C_{12}H_{16}O_{12} . H_2O$.	Ber.:	C 38,92	H 4,86	O 56,22
	Gef.:	C 39,00	H 4,61	O 56,39

0,1440 g der vakuumtrockenen Säure neutralisieren 7,8 ccm n/10 Natronlauge. 1 g Säure neutralisiert demnach 54,0 ccm n/10 NaOH.

$C_{10}H_{14}O_8(COOH)_2 . H_2O$. Ber.: 54,0 ccm NaOH.

0,1440 g der vakuumtrockenen Säure in 8 ccm n/10 Natronlauge gelöst, zeigen im 2-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D^{20} = + 10,0^0$. $c = 1,8$.

$$[\alpha]_D^{20} = + 277,8^0.$$

Zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration wurde eine 0,1 proz. Lösung des Hydrats der Digalakturonsäure a in Wasser hergestellt und in dem *Michaelis-Walepole*schen Komparator mit den Indikatorlösungen verglichen.

Es wurde $p_H = 3,3$ gefunden.

Natriumsalz des Hydrats der Digalakturonsäure a.

1,0364 g vakuumtrockener Säure wurden in 100 ccm Wasser suspendiert und mit n/10 Natronlauge gegen Phenolphthalein bis zur Neutralisation titriert. Verbrauch: 55,1 ccm n/10 NaOH.

Die filtrierte Lösung wurde in einer Platinschale auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen eingeengt und in Alkohol eingetragen. Das in weißen Flocken ausfallende Natriumsalz wurde abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 110° getrocknet.

0,1862 g getrockneten Natriumsalzes wurden im Platintiegel mit Schwefelsäure abgeraucht, wobei sich 0,0632 g Na_2SO_4 ergaben:

für $C_{10}H_{14}O_8 . (CO_2Na)_2 . H_2O$. Ber.: 11,11 Proz. Na
Gef.: 11,01 „ Na

0,1742 g des getrockneten Natriumsalzes wurden in 10 ccm Wasser gelöst.

Drehung im 2-dm-Rohr: $\alpha_D^{20} = + 7,77^0$.

$$[\alpha]_D^{20} = + 228,8^0.$$

Molekulargewichtsbestimmung des Natriumsalzes nach der Methode der Gefrierpunktserniedrigung. 0,3478 g vakuumtrockenes Natriumsalz in 10,0 g Wasser gelöst ergaben eine Gefrierpunktserniedrigung $\Delta_t = 0,160^0$.

$$\text{Mol. Gew.} = \frac{185,8 \ . \ 0,3478}{0,160}$$

$C_{12}H_{14}O_{12}Na_2 . H_2O$. Ber.: 414
Gef.: 404

0,0348 g getrockneten Natriumsalzes reduzieren in der Hitze 0,4 ccm *Fehling*scher Lösung, dementsprechend 1 g 11,5 ccm *Fehling*scher Lösung.

Digalakturonsäure b.

Das salzsaure Filtrat der oben beschriebenen Digalakturonsäure a wurde mit dem dreifachen Volumen Alkohol versetzt, worauf ein gallertartiger, nach einigem Stehen sich zusammenballender Niederschlag ausfiel, *die Digalakturonsäure b*. Dieser Niederschlag wurde abfiltriert, zur weiteren Reinigung noch einmal in wenig Wasser gelöst und nach dem Filtrieren der Lösung in das fünffache Volumen Alkohol eingetragen. Die Digalakturonsäure b fiel erst nach Zusatz eines Elektrolyten, z. B. ein wenig verdünnter Salzsäure, aus. Nach dem Abfiltrieren des Niederschlages, Eintragen in Alkohol, dann in Äther, wurde die Substanz im Mörser zur Verdunstung des Äthers verrieben und im Vakuum bei 100° getrocknet.

Ausbeute: 0,7 g Digalakturonsäure b, entsprechend *9,8 Proz. auf Pektinsäure gerechnet.*

Die trockene Säure bildete ein farbloses Pulver, das sich leicht schon bei gewöhnlicher Temperatur in Wasser und Salzsäure löst, dadurch also schon scharf von der oben erwähnten Digalakturonsäure a unterschieden ist, wie auch ihre Konstanten zeigen.

Mit Metallsalzen und Erdalkalien gibt die Säure flockige Niederschläge.

Die *Digalakturonsäure b* besitzt eine auf die Formel $C_{12}H_{16}O_{12}$ stimmende Zusammensetzung.

Elementaranalyse der vakuumtrockenen Säure:

0,2030 g Substanz liefern 0,3022 g CO_2, 0,0850 g H_2O, 0,0025 g Asche; auf aschenfreie Substanz bezogen (0,2005 g):

für $C_{12}H_{16}O_{12}$.	Ber.:	C 40,91	H 4,55	O 54,54
	Gef.:	C 41,11	H 4,74	O 54,15

0,1337 g der vakuumtrockenen Säure neutralisieren 6,7 ccm n/10 Natronlauge, 1 g Säure demnach *50,1 ccm n/10 NaOH,*

für $C_{10}H_{14}O_8(COOH)_2$. Ber.: 56,8 ccm n/10 NaOH.

Der geringere Verbrauch an Lauge zur Neutralisation gegenüber dem berechneten Werte scheint sich aus dem höheren Aschengehalt des Präparats zu erklären.

0,2083 g der vakuumtrockenen Säure, in 10 ccm Wasser gelöst, zeigen im 2-dm-Rohr die *Drehung* $\alpha_D = + 10{,}1^0$. $c = 2{,}08$.

$$[\alpha]_D = + 242{,}8^0.$$

Die Wasserstoffionenkonzentration der auf 0,1 Proz. verdünnten Lösung der Digalakturonsäure b wurde zu $p_H = 3{,}3$ gefunden.

Natriumsalz der Digalakturonsäure b.

Digalakturonsäure b wurde in wässeriger Lösung genau mit n/10 Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiert und die Flüssigkeit nach dem Einengen in einer Platinschale auf dem Wasserbad in Alkohol eingetragen. Das in weißen Flocken ausfallende Natriumsalz wurde abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,0995 g des getrockneten Salzes wurden in einem Platintiegel mit Schwefelsäure verascht. Das erhaltene Natriumsulfat wog 0,0334 g.

	Gef.:	10,88	Proz.	Na
für $C_{10}H_{14}O_8(CO_2Na)_2$.	Ber.:	11,62	„	Na
für $C_{10}H_{14}O_8(CO_2Na)_2 \cdot H_2O$.	Ber.:	11,11	„	Na

Das Natriumsalz der Digalakturonsäure b scheint gegenüber der Formel der freien Säure in seiner Zusammensetzung einen Mehrgehalt von 1 Molekül H_2O aufzuweisen und dieselbe Bruttoformel zu besitzen wie das oben beschriebene Na-Salz des Hydrats der Digalakturonsäure a. Trotzdem handelt es sich hier um voneinander verschiedene isomere Verbindungen, die auch deutliche Unterschiede in der spezifischen Drehung und in der Reduktionsfähigkeit zeigen.

Wenn man außerdem die wässerige Lösung des Natriumsalzes der Digalakturonsäure a mit Salzsäure versetzt, so fällt sofort die darin unlösliche

freie *Digalakturonsäure a* aus, während beim Zusatz von Salzsäure zu der Lösung des Natriumsalzes der *b-Säure* in Wasser die Flüssigkeit *klar bleibt.*

0,1534 g vakuumtrockenes Natriumsalz der Polygalakturonsäure b in 10 ccm Wasser gelöst zeigt im 0,5-dm-Rohr die *Drehung* $\alpha_D^{20} = + 1,56°$.

$$[\alpha]_D^{20} = + 203,9°.$$

0,0254 g vakuumtrockenen Natriumsalzes reduzieren in der Hitze 0,6 ccm *Fehling*scher Lösung, dementsprechend 1 g Natriumsalz 23,9 ccm *Fehling*scher Lösung.

Molekulargewichtsbestimmung des Natriumsalzes der Digalakturonsäure b.

0,2537 g vakuumtrockenen Salzes in 10,0 g Wasser gelöst ergaben eine Gefrierpunktserniedrigung $\Delta_t = 0,130°$.

$$\text{Mol. Gew.} = \frac{185,8 \cdot 0,2537}{0,130}$$

$C_{12}H_{14}O_{12}Na_2 \cdot H_2O$. Ber.: 414

Gef.: 363

d-Galakturonsaures Calcium.

Das bei der Spaltung der Pektinsäure mit Salzsäure und Fällung mit Alkohol verbleibende Filtrat der Digalakturonsäure b wurde im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedampft, nach Aufnahme mit Wasser mit Calciumcarbonat unter Erhitzen auf dem Wasserbad neutralisiert, mit Tierkohle entfärbt und nach dem Filtrieren in Alkohol eingetragen, worauf *das Calciumsalz der d-Galakturonsäure* in gelblichen Flocken ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und imVakuum bei 100° getrocknet, wobei ein gelbliches Pulver erhalten wurde. 0,8 g Calciumsalz entsprechend *9 Proz. d-Galakturonsäure* auf *Pektinsäure* gerechnet.

Weitere Untersuchungen auf die bei der Spaltung entstandenen Kohlehydrate wurden in diesem Falle nicht angestellt, da sich eine Trennung der Zucker von dem durch Neutralisation der Salzsäure entstandenen Calciumchlorid zu schwierig gestaltet.

Pektinsäure (Präparat 2).

40 g rohen Calcium-Magnesiumsalzes der Pektinsäure aus Hydropektin von Rübenschnitzeln wurden in 2 Liter Wasser gelöst, die trübe Lösung über Kieselgur filtriert und das Filtrat im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedampft. Die erkaltete Lösung wurde mit Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion gegen Kongopapier versetzt und dann in 2 Liter Alkohol eingetropft, worauf die Pektinsäure in gallertartigen Flocken ausfiel. Die Säure wurde abfiltriert, mit Alkohol nachgewaschen und in 800 ccm Wasser wieder gelöst. Beim Eintropfen der filtrierten Lösung in 3 Liter Alkohol fiel die Pektinsäure wieder in gallertartigen Flocken aus, die abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 110° getrocknet wurden.

Ausbeute: 14,5 g Pektinsäure in Form eines farblosen Pulvers.

Elementaranalyse der im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd nachgetrockneten Säure.

0,1926 g Substanz: 0,3080 g CO_2, 0,0920 g H_2O, 0,0020 g Asche (= 1,04 Proz.). Auf aschenfreie Substanz bezogen (0,1906 g):

C 44,07 H 5,40 O 50,53

0,2234 g der vakuumtrockenen Säure in 20 ccm Wasser gelöst zeigen im 1-dm-Rohr die *Drehung* $\alpha_D^{20} = +1{,}27^0$. $c = 1{,}12$.

$$[\alpha]_D^{20} = +113{,}4^0.$$

Methoxylbestimmung nach *Zeisel-Fanto-Stritar.*

0,4925 g vakuumtrockener Säure liefern 0,2312 g Ag J, entsprechend *6,2 Proz. Methoxyl in der Pektinsäure.*

Zur Essigsäurebestimmung wurden 5,0133 g vakuumtrockener Pektinsäure in einem Rundkolben in 300 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit n/10 Barytwasser gegen Phenolphthalein als Indikator titriert. Es wurden 73,5 ccm n/10 Barytwasser verbraucht.

1 g Pektinsäure verbraucht demnach zur Neutralisation 14,7 ccm n/10 Barytwasser.

Dann wurden 100 ccm n/10 Barytwasser im Überschuß zugegeben und der Rundkolben gut verschlossen stehengelassen. Nach wenigen Minuten schied sich aus der Lösung ein flockiger Niederschlag aus, der sich schnell vermehrte, so daß nach kurzer Zeit die Flüssigkeit in eine breiige Gallerte verwandelt war. Die Abscheidung bestand aus dem *Bariumsalz der Digalakturonsäure a,* die sich durch Hydrolyse aus der Pektinsäure gebildet hatte.

Nach 2½ Stunden war die Lösung nur noch schwach alkalisch und verbrauchte zur Neutralisation 2,5 ccm n/10 Schwefelsäure.

Es wurde ein weiterer Überschuß von 96,6 ccm n/10 Barytwasser zugegeben und im gut verschlossenen Kolben über Nacht stehengelassen. Zur Rücktitration wurden 42,3 ccm n/10 Schwefelsäure verbraucht.

Der Gesamtverbrauch bei der Einwirkung von Barytwasser auf Pektinsäure in der Kälte belief sich also auf 151,8 ccm n/10 Barytwasser.

Die Lösung wurde nunmehr mit 193,2 ccm n/10 Barytwasser versetzt und im Rundkolben auf dem Wasserbad bei Benutzung eines Kühlers mit aufgesetztem Natronkalkrohr, um die Kohlensäure der Luft fernzuhalten, 5 Stunden erhitzt.

Beim Zurücktitrieren wurden 90,1 ccm n/10 Schwefelsäure verbraucht. Aus dem Verbrauch von 103,1 ccm n/10 Barytwasser bei der Verseifung in der Hitze würde sich berechnen, daß 0,6186 g Essigsäure aus der Pektinsäure abgespalten sind, entsprechend 12,34 Proz. in der trockenen Pektinsäure.

Zur genaueren Bestimmung der Essigsäure wurde die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, so daß eine etwa 1proz. schwefelsaure Lösung entstand, welche mit Wasserdampf destilliert wurde. Die erhaltenen Destillate wurden mit n/10 Barytwasser gegen Phenolphthalein titriert.

Das	1. Liter	Destillat	neutralisiert	41,5	ccm	n/10 Barythydrat
,,	2. ,,	,,	,,	34,7	,,	,,
,,	3. ,,	,,	,,	14,8	,,	,,
,,	4. ,,	,,	,,	10,1	,,	,,
,,	5. ,,	,,	,,	4,3	,,	,,
,,	6. ,,	,,	,,	3,2	,,	,,
,,	7. ,,	,,	,,	2,6	,,	,,
,,	8. ,,	,,	,,	2,3	,,	,,
,,	9. ,,	,,	,,	1,5	,,	,,
,,	10. ,,	,,	,,	1,8	,,	,,
,,	11. ,,	,,	,,	1,3	,,	,,

Die Gesamtacidität der Destillate entspricht also 118,1 ccm n/10 Barythydrat.

Die ersten 8 Liter der neutralisierten Destillate wurden in einer Porzellanschale auf ein kleines Volumen eingeengt und in dieser Lösung die Ameisensäure bestimmt. Erhalten 0,6222 g Hg_2Cl_2, entsprechend 0,0607 g Ameisensäure.

Da 0,0607 g Ameisensäure 13,2 ccm n/10 Barytwasser neutralisieren, muß diese Summe zur Berechnung der wirklich vorhandenen Essigsäure von der Gesamtacidität der ersten 8 Liter Destillat entsprechend 113,5 ccm n/10 Baryt subtrahiert werden. 100,3 ccm n/10 Barytwasser neutralisieren 0,6018 g Essigsäure, dem entspricht also ein Gehalt von *12,3 Proz. Essigsäure in der trockenen Pektinsäure.*

Das 9. bis 11. Liter der neutralisierten Destillate wurde ebenfalls auf ein kleines Volumen eingedampft und darin die Ameisensäure wie oben bestimmt.

Erhalten 0,1688 g Hg_2Cl_2, entsprechend 0,0165 g Ameisensäure. Diese Säuremenge verbraucht zur Neutralisation 3,6 ccm n/10 Barytwasser, während die Gesamtsäure in diesen Destillaten 4,6 ccm n/10 Baryt neutralisiert.

Die gegen Ende des Versuchs überdestillierte Säure bestand also vorwiegend aus Ameisensäure.

Zu einer vorläufigen Untersuchung auf die neben der Galakturonsäure bei der Säurespaltung der Pektinsäure entstandenen Monosaccharide wurde die von flüchtigen Säuren befreite Hydrolysenflüssigkeit mit Bariumcarbonat unter Erhitzen auf dem Wasserbad neutralisiert, mit Tierkohle entfärbt, filtriert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Dieser Rückstand wurde mit 92proz. Alkohol erschöpfend auf dem Wasserbad am Rückflußkühler ausgekocht und die alkoholische Lösung im Vakuum zur Trockne verdampft, wobei ein sirupöser, erhärtender Rückstand hinterblieb, in dem aus der Pektinsäure herstammende reduzierende Kohlehydrate enthalten waren. Diesen Sirup löste man in Wasser, füllte die Lösung im Meßkolben zu 100 ccm auf und stellte in einem aliquoten Teil durch Titration mit *Fehling*scher Lösung die Menge des Gesamtzuckers in der Lösung fest.

1 ccm der Lösung reduzierte 0,8 ccm *Fehling*scher Lösung. Da 1 ccm *Fehling*scher Lösung 0,005 g Glucose entspricht, waren in der Lösung etwa 0,4 g Gesamtzucker auf Glucose berechnet.

35 ccm der Lösung, enthaltend 0,14 g Gesamtzucker wurden der Furfuroldestillation unterworfen, wobei sich 0,0546 g Phloroglucid ergaben, entsprechend 0,066 g Arabinose oder *47,15 Proz. Arabinose* auf Gesamtzucker des Sirups berechnet.

d-Galaktose als ein Spaltprodukt der Pektinsäure.

Pektinsäure derselben Darstellungsart wie die bei den vorhergehenden Versuchen verwandte wurde durch 15stündiges Kochen mit 2proz. Schwefelsäure am Rückflußkühler vollkommen hydrolysiert. Die saure Lösung wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert, mit Tierkohle entfärbt und nach dem Filtrieren im Vakuum zur Trockne verdampft. Durch Auskochen des braunen, sirupösen Rückstandes mit 88proz. Alkohol und Eindampfen der alkoholischen Lösung zum Sirup gelang es, nach Impfen

des Sirups mit Spuren kristallisierter d-Galaktose einen Zucker in kristallinischer Form abzuscheiden, der sich, wie die nachstehenden Untersuchungen ergeben, als d-Galaktose erwies.

Die Kristalle wurden mit 90proz. Alkohol verrieben, abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1696 g der vakuumtrockenen Substanz wurden in 10 ccm Wasser gelöst.

Die Lösung zeigte starke Mutarotation.

Die Anfangsdrehung im 2 dm-Rohr zeigte $\alpha_D = + 4{,}34^0$, die Enddrehung, die sich nach 6 Stunden einstellte, $\alpha_D = + 2{,}74^0$.

Hiernach berechnet sich $[\alpha]_D = + 80{,}8^0$, während *Tollens*[1]) als Enddrehung der d-Galaktose $[\alpha]_D = + 80{,}5^0$ angibt.

Ein Teil der Galaktosekristalle wurde in einem kleinen Becherglas mit Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,15 auf dem Wasserbad erhitzt. Nachdem die Lösung auf ein Drittel des Anfangsvolumens eingedampft war, wurde sie in der Kälte stehengelassen. Nach einigem Stehen schieden sich die typischen Kristalle der *Schleimsäure* ab, die abgesaugt, nachgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurden. Die Kristalle zeigten den Schmelzpunkt 212°, während *Tollens*[2]) den Schmelzpunkt der Schleimsäure zu 213° angibt.

l-Arabinosediphenylhydrazon und d-Galaktose-α-Methylphenylhydrazon aus Pektinsäure.

6 g derselben Pektinsäure vom spezifischen Drehungsvermögen $[\alpha]_D = + 113{,}4^0$ wurden 15 Stunden mit 400 ccm 2proz. Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht. Dann wurde die Lösung mit Bariumcarbonat neutralisiert, mit Tierkohle entfärbt, filtriert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Den Rückstand kochte man mit 90proz. Alkohol erschöpfend aus und dampfte die alkoholische Lösung zum Sirup ein.

Dieser Sirup wurde mit 0,6 g Diphenylhydrazin und 20 ccm absolutem Alkohol verrührt und eine Viertelstunde auf dem Wasserbad erhitzt. Nach kurzer Zeit schieden sich gelblich gefärbte Kristallmassen aus, die bald die Schale breiartig erfüllten. Nach 24 Stunden langem Stehen in der Kälte wurde die Substanz abgesaugt, mit Alkohol und Äther nachgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Erhalten: *0,66 g fast rein weißes l-Arabinosediphenylhydrazon.*

0,2 g dieser Verbindung zeigen, in einem warmen Gemisch von 4 ccm Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol gelöst, im 1-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D = + 0{,}38^0$, während *Neuberg*[3]) bei denselben Arbeitsbedingungen $\alpha_D = + 0{,}7^0$ gefunden hat.

Das Arabinosediphenylhydrazon wurde dann noch zweimal aus 50proz. wässeriger Pyridinlösung unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Im Vakuum getrocknet, zeigte es den konstanten Schmelzpunkt 199 bis 200°. *Tollens*[4]) gibt den Schmelzpunkt des l-Arabinosediphenylhydrazons zu 204° an.

---

[1]) *Tollens*, Handb. d. Kohlenhydrate 1914, S. 286.

[2]) *Derselbe*, ebendaselbst 1914, S. 301.

[3]) Ber. 33, 2243, 1900.

[4]) Ber. 38, 500, 1905.

Das Filtrat des Arabinosehydrazons wurde in einer kleinen Schale zum Sirup eingedampft, mit 0,6 g α-Methylphenylhydrazin, 10 ccm Alkohol und wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure verrührt und eine Viertelstunde auf dem Wasserbad erhitzt, wobei sich zunächst nichts ausschied. Nach 24 Stunden langem Stehen in der Kälte hatten sich dann geringe Mengen eines gelben Niederschlags gebildet, der abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde (0,09 g). Die Substanz wurde noch einmal aus 30proz. Alkohol umkristallisiert und zeigte den Schmelzpunkt des *Galaktose-α-Methylphenylhydrazons* 182 bis 183°.

Ofner[1]) gibt den Schmelzpunkt 180 bis 183° an.

Pektinsäure (Präparat 3).

Verhalten von Hydropektin bei der alkoholischen Gärung und Isolierung der Pektinsäure aus dem Gärgemisch.

5 g Hydropektin aus Rübenschnitzeln (lufttrocken mit 7,68 Proz. Wassergehalt) wurden in 1 Liter Wasser gelöst. Die Lösung zeigte im 2-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D = +1{,}1^0$ Saccharose.

In der Flüssigkeit löste man nunmehr 100 g Rohrzucker.

Drehung der Hydropektin und Zucker enthaltenden Lösung im 2-dm-Rohr $\alpha_D = +37{,}7^0$ Saccharose.

Hierauf wurden 10 g frischer Bäckerpreßhefe fein verteilt in die in einem Kolben befindliche Flüssigkeit eingetragen. Die Gärung fand bei Zimmertemperatur statt, wobei bis auf lebhafte Gasentwicklung äußerlich keine Veränderung der Flüssigkeit wahrnehmbar war.

Drehung des Hefefiltrats nach 7 Tagen im 2-dm-Rohr $\alpha_D = -0{,}8^0$ Saccharose
„ „ „ „ 9 „ „ 2- „ $\alpha_D = +1{,}0^0$ „

Nach beendeter Gärung wurde die Hefe mit Kieselgur abfiltriert und das hellgelbe, klare Filtrat auf 200 ccm eingedampft. Die eingengte Lösung wurde in 600 ccm Alkohol eingetragen, worauf das Calcium-Magnesiumsalz der Pektinsäure in gallertartigen Flocken ausfiel, die abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 110° getrocknet wurden. 3 g farbloses Pulver.

Zur Darstellung der freien Pektinsäure wurde das Salz in wenig Wasser gelöst, zu der Lösung 5 ccm konzentrierte Salzsäure zugegeben und die filtrierte Flüssigkeit in Alkohol eingetragen. Die in farblosen Flocken ausgefallene Pektinsäure wurde abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,2023 g der vakuumtrockenen Säure in 10 ccm Wasser gelöst zeigen im 1-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D = +2{,}46^0$.

$$[\alpha]_D^{20} = +121{,}9^0.$$

Methoxylbestimmung nach *Zeisel-Fanto-Stritar.*

0,4966 g vakuumtrockener Pektinsäure liefern 0,2268 g AgJ, dem entspricht ein Gehalt von *6,03 Proz. Methoxyl in der Pektinsäure.*

Aus dem Resultat der Bestimmung der Drehung und des Methoxylgehalts ist also zu erkennen, daß die Hefe ohne wesentliche Einwirkung auf das Hydropektin geblieben ist, daß vielmehr eine Pektinsäure gewonnen wurde, die fast die gleichen Eigenschaften wie die früher beschriebene Verbindung besitzt und ungefähr denselben Methoxyl- und Essigsäuregehalt (vgl. S. 320).

---

[1]) Chem. Centralbl. **1907**, I, 995.

Pektinsäure (Präparat 4).

81 g rohes Calcium-Magnesiumsalz aus Hydropektin von Rübenschnitzeln wurden in 1 Liter Wasser gelöst. Je 100 ccm dieser Lösung wurden mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt, die einzelnen Portionen sofort über Kieselgur filtriert und in Alkohol eingetropft. Die Arbeit in diesen kleinen Mengen war nötig, da bei dem Filtrieren eines größeren Flüssigkeitsvolumens zu befürchten war, daß die Salzsäure bei einer zu langen Einwirkung infolge von Spaltungen doch schon Veränderungen in der Pektinsäure hervorrufen konnte. Die in gallertartigen Flocken ausfallende Pektinsäure wurde abfiltriert, zweimal in Alkohol, dann in Äther suspendiert, abgesaugt und im Mörser zur Vertreibung des Äthers gut verrieben.

Bei 110° getrocknet, stellte die Pektinsäure ein schwach gelblich gefärbtes Pulver dar (39 g).

Elementaranalyse der im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrockneten Pektinsäure.

0,2768 g Substanz liefern 0,4395 g CO_2, 0,1349 g H_2O, 0,0010 g Asche (= 0,37 Proz.), auf aschenfreie Substanz bezogen, wurde gefunden:

C 43,46 H 5,47 O 51,07

0,1015 g vakuumtrockener Säure neutralisieren gegen Phenolphthalein als Indikator 1,5 ccm n/10 Natronlauge. 1 g Pektinsäure neutralisiert demnach *14,8 ccm n/10 NaOH.*

0,2030 g vakuumtrockener Säure in 10 ccm Wasser gelöst zeigen im 0,5-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D^{20} = + 1,67°$. $c = 2,03$.

$$[\alpha]_D^{20} = + 164,0°.$$

Molekulargewichtsbestimmung nach der kryoskopischen Methode.

0,2229 g Pektinsäure, im Vakuum über P_2O_5 bei 100° C 6 Stunden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, in 20 ccm Wasser gelöst.

Gefrierpunktserniedrigung $\Delta_t = 0,015°$.

$$\textit{Gef. Molekelgewicht} = \frac{185,8 \,.\, 0,1114}{0,015} = 1380.$$

für $C_{43}H_{62}O_{37}$. Ber.: 1170
für $C_{43}H_{62}O_{37} + 10\,H_2O$. Ber.: 1350

Methoxylbestimmung nach *Zeisel-Fanto-Stritar.*

0,2479 g vakuumtrockener Pektinsäure liefern 0,1268 g AgJ, dem entspricht ein Gehalt von *6,8 Proz. Methoxyl in der Pektinsäure.*

Furfuroldestillation:

0,3600 g vakuumtrockener Pektinsäure liefern mit 12proz. Salzsäure destilliert 0,1175 g Furfurolphloroglucid, entsprechend einem *scheinbaren Gehalt von* 37,3 *Proz. Arabinose in der Pektinsäure.*

Um einen Anhaltspunkt darüber zu gewinnen, wieviel *Galakturonsäure* überhaupt im Molekül der Pektinsäure anzunehmen ist, wurde die von *Tollens-Lefèvre*[1]) für die Bestimmung von Glykuronsäure ausgearbeitete Methode auf die vorliegende Untersuchung übertragen.

0,3394 g vakuumtrockener Pektinsäure lieferten nach dieser Methode mit 12proz. Salzsäure destilliert 0,050 g CO_2.

---

[1]) Ber. 40, 4513, 1907.

Diese Menge entspricht zufolge der Gleichung

$$\underset{\text{Galakturonsäure}}{C_6H_{10}O_7} = \underset{\text{Furfurol}}{C_5H_4O_2} + 3\,H_2O + CO_2$$

0,22 g Galakturonsäure. Hieraus berechnen sich *64,8 Proz. Galakturonsäure in der Pektinsäure.*

Die Salzsäuredestillation der Pektinsäure nach der *Tollens*schen Methode gibt Furfurol, das sowohl aus der Arabinose wie aus der Galakturonsäure stammt.

Es ist nun möglich, die aus der Menge der abgespaltenen CO_2 ermittelte Galakturonsäuremenge in Furfurolphloroglucid umzurechnen. Aus der Differenz des durch Umrechnung aus der Galakturonsäure erhaltenen Furfurolphloroglucids von der durch Salzsäuredestillation gewonnenen Gesamtphloroglucidmenge läßt sich berechnen, wieviel Furfurol nur durch Zersetzung der Arabinose gebildet worden ist, und ebenfalls auch mit Hilfe der *Kröber*schen Tabellen[1]) der Prozentsatz der Arabinose in der Pektinsäure.

Nach Untersuchungen von *F. Schubert*[2]) im hiesigen Institut wird hierbei zur Grundlage genommen, daß ein Teil Furfurolphloroglucid 2,94 Teilen Galakturonsäure entspricht.

1 g Pektinsäure enthält 0,648 g *Galakturonsäure*, dem entspricht durch Division mit dem oben genannten Faktor *0,2204 g Furfurolphloroglucid.*

1 g Pektinsäure liefert bei der Salzsäuredestillation aus der Zersetzung der *Arabinose und der Galakturonsäure*, wie die früher angegebenen Versuche zeigen, *0,321 g Furfurolphloroglucid.*

Die der Differenz der beiden Werte entsprechende Menge von 0,1006 g Furfurolphloroglucid entsteht also bei der Salzsäuredestillation von 1 g Pektinsäure als Phloroglucidniederschlag des Furfurols aus der Arabinose.

Daraus folgt ein Gehalt von 0,1167 g Arabinose oder *11,67 Proz. Arabinose in der Pektinsäure.*

Da das Verhältnis von Arabinose zu Galaktose, wie früher gezeigt (S. 312), in dem durch Spaltung der Pektinsäure erhaltenen Zuckersirup ungefähr wie 47,15 : 52,85 gefunden wurde, läßt sich jetzt mit einiger Annäherung der Anteil der *Galaktose zu 13,1 Proz. in der Pektinsäure* berechnen.

Hydrolyse der Pektinsäure mit 2proz. Schwefelsäure.

16 g lufttrockener Pektinsäure wurden in 1 Liter 2proz. Schwefelsäure gelöst.

Drehung der Lösung: $a_D = +\,6{,}0^0$ Saccharose. $l = 1$.

Dann wurde die Flüssigkeit am Rückflußkühler über kleiner Flamme gekocht.

Nach	Stdn. langem Kochen Drehung im 1-dm-Rohr		$a_D =$
Nach ¼	Stdn. langem Kochen Drehung im 1-dm-Rohr	+ 7,0⁰	Saccharose
„ ½	„ „ „ „ „ „	+ 7,0	„
„ 1	„ „ „ „ „ „	+ 6 1	„
„ 6	„ „ „ „ „ „	+ 5,8	„
„ 10	„ „ „ „ „ „	+ 4,2	„
„ 12½	„ „ „ „ „ „	+ 3,5	„
„ 15½	„ „ „ „ „ „	+ 2,8	„
„ 17½	„ „ „ „ „ „	+ 2,4	„

[1]) *van der Haar*, Anleitung zum Nachweis und zur Bestimmung der Monosaccharide usw. 1920, S. 77.

[2]) Vgl. die später folgende Arbeit von *F. Ehrlich* und *F. Schubert.*

Bemerkenswert ist, daß in der ersten halben Stunde des Kochens die Drehung der Lösung deutlich ansteigt entsprechend der anfänglichen Abspaltung der hochdrehenden Digalakturonsäuren. Die Drehung sinkt dann in dem Maße, wie diese Verbindungen allmählich zur monomolekularen d-Galakturonsäure aufgespalten werden, die schließlich selbst durch das lange Kochen zum Teil weitergehend zersetzt wird.

Die braun gefärbte Lösung wurde unter Erhitzen auf dem Wasserbad mit Bariumcarbonat neutralisiert, mit Tierkohle entfärbt, filtriert und im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt. Durch Eintragen in Alkohol fiel das *Bariumsalz der Galakturonsäure* aus, das abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 110° getrocknet wurde. 6,9 g schwach gelb gefärbte Substanz. Die Weiterverarbeitung dieses Salzes auf die freie Säure wird weiter unten beschrieben (S. 321).

Das alkoholische Filtrat, das die bei der Hydrolyse neben der Galakturonsäure abgespaltenen Kohlehydrate enthalten mußte, wurde im Vakuum zu Sirup eingedampft.

1,39 g des Sirups wurden in 50 ccm Wasser gelöst. Die Lösung zeigte im 0,5-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D = + 0{,}66°$. $[\alpha]_D = + 23{,}7°$.

1 ccm dieser Lösung verbrauchte bei der Titration in der Hitze 3,88 ccm *Fehling*scher Lösung, die Gesamtmenge der Lösung also 194 ccm *Fehling*scher Lösung, entsprechend 0,97 g Gesamtzucker als Dextrose berechnet.

Die *Rosenthaler*sche Reaktion auf Methylpentosen in diesem Sirup fiel negativ aus (s. S. 306).

l-Arabinose- und d-Galaktose-Benzylphenylhydrazon aus Pektinsäure.

2,7 g des Sirups wurden in 38 ccm 75proz. Alkohol gelöst, wobei ein braun gefärbter unlöslicher Rückstand blieb, der abfiltriert wurde und sich als das Bariumsalz der Galakturonsäure erwies, das noch nicht vollständig durch Alkohol ausgefällt worden war.

Zu der alkoholischen Lösung wurden 3 g Benzylphenylhydrazin zugegeben und die Mischung auf dem Wasserbad schwach erwärmt. Nach 5 Minuten begann die Lösung sich zu trüben und nach einigem Stehen in der Kälte schied sich das Arabinosehydrazon in Flocken aus. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit 75- und 96proz. Alkohol, dann mit Äther nachgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

1,3 g fast reines *l-Arabinose-Benzylphenylhydrazon.*

Das Hydrazon wurde nochmals aus 75proz. Alkohol umkristallisiert und dabei rein weiß erhalten. Es hatte den Schmelzpunkt 173°, während *Ruff* und *Ollendorf*[1]) 174° angeben.

Stickstoffbestimmung. 0,3097 g vakuumtrockenes Arabinosebenzylphenylhydrazon ergab 24,1 ccm Stickstoff bei $t = 20°$, $b = 753$ mm.

$C_{18}H_{22}O_4N_2$. Ber.: 8,48 Proz. N.
Gef.: 8,77 „ N.

Das Filtrat des Arabinosehydrazons wurde mit Wasser versetzt, wobei es sich trübte. Nach 2 Tage langem Stehen hatte sich ein Niederschlag gebildet, der abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurde. Gewicht 0,8 g.

[1]) Ber. 32, 3234, 1900.

Die noch gelb gefärbte Substanz wurde aus 30 proz. Alkohol umkristallisiert unter Zusatz von Tierkohle, wobei eine rein weiße Substanz erhalten wurde, die den Schmelzpunkt 157 bis 158° des d-Galaktosebenzylphenylhydrazons besaß. *Behrend* und *Hofmann*[1]) fanden ebenfalls für dieses Hydrazon 157 bis 158°.

Spaltung der Pektinsäure mit Baryt.

4,45 g vakuumtrockener Pektinsäure wurden in 300 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit Baryt gegen Phenolphthalein titriert.

Verbrauch: 60,3 ccm n/10 Barytwasser.

1 g Pektinsäure neutralisiert demnach 13,5 ccm n/10 Baryt. Zu dieser Flüssigkeit wurden 200 ccm Barytlösung zugegeben (10 ccm der Barytlösung entsprachen 23 ccm n/10 Schwefelsäure).

Nach kurzer Zeit schied sich ein weißer, gallertartiger Niederschlag ab, das *Bariumsalz der Digalakturonsäure a*, die durch Spaltung der Pektinsäure entstanden war. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen und in verdünnter Salzsäure suspendiert, wobei das Barium in Lösung ging und die freie Säure sich aus dem Salz bildete.

Die unlösliche Säure wurde abfiltriert, mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen, dann mit Alkohol und Äther und bei 110° getrocknet. Da die rein weiße Säure (2,25 g) noch aschenhaltig war, wurde sie noch einmal umgefällt, indem sie in kochendem Wasser gelöst wurde und die Lösung nach dem Filtrieren in der Kälte mit einem Überschuß von Salzsäure versetzt wurde. Die schneeweiß ausfallende Substanz wurde abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum bei 100° getrocknet.

Hydrat der Digalakturonsäure a.

Elementaranalyse. 0,2329 g Substanz (vakuumtrocken): 0,3337 g CO_2, 0,0995 g H_2O, 0,0004 g Asche. Auf aschenfreie Substanz bezogen (0,2325 g):

$C_{12}H_{16}O_{12} . H_2O$.	Ber.:	C 38,92	H 4,86	O 56,22
	Gef.:	C 39,14	H 4,79	O 56,07

0,0985 g vakuumtrockener Säure neutralisieren 5,3 ccm n/10 Natronlauge.

1 g Säure neutralisiert demnach: 53,80 ccm n/10 NaOH;
für $C_{10}H_{14}O_8(CO_2H)_2 . H_2O$ ber.: 54,5 „ n/10 NaOH.

0,1971 g vakuumtrockener Säure in 10 ccm n/10 NaOH gelöst zeigen im 2-dm-Rohr die Drehung $a_D = + 10,76^0$

$$[a]_D = + 273,1^0.$$

Wasserstoffionenkonzentration der 0,1 proz. wässerigen Lösung der Säure $p_H = 3,3$.

Digalakturonsäure b.

Das salzsaure Filtrat der Digalakturonsäure a wurde mit verdünnter Schwefelsäure zur Ausfällung des Bariums versetzt und nach dem Filtrieren im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt. Mit Alkohol fiel dann die *Polygalakturonsäure b* als flockiger Niederschlag, der abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 110° getrocknet wurde.

Die rein weiße pulverförmige Substanz wog 0,34 g. Da die Säure auch aschenhaltig war, wurde sie in wenig Wasser gelöst, zu der Lösung etwas

---

[1]) Ann. d. Chem. 336, 277, 1909.

Salzsäure zugesetzt und dann ein Überschuß von Alkohol. Die rein weiß ausfallende Säure wurde filtriert und wie oben gewaschen und getrocknet. Bei der Veraschung auf dem Platinspatel zeigte sie noch geringen Aschengehalt.

0,0875 g der vakuumtrockenen Polygalakturonsäure b neutralisieren 4,3 ccm n/10 Natronlauge gegen Phenolphthalein als Indikator.

1 g Säure neutralisiert demnach: 49,1 ccm n/10 NaOH;
für $C_{10}H_{14}O_8(CO_2H)_2$ ber.: 56,8 ccm n/10 NaOH.

Die geringere Acidität erklärt sich auch hier aus dem Aschengehalt der Säure.

0,1750 g vakuumtrockener Säure in 10 ccm Wasser gelöst zeigen eine Drehung von $\alpha_D = + 8{,}64^0$ im 2-dm-Rohr. $c = 1{,}75$.

$$[\alpha]_D = + 247^0.$$

Anhydride von Monosacchariden in der Pektinsäure.

Bei der Barytspaltung der Pektinsäure ergaben sich im Filtrat des digalakturonsauren Bariums linksdrehende Substanzen, die vermutlich die Monosaccharide der Pektinsäure noch in anhydridartiger Bindung verknüpft enthalten, wie die folgenden Untersuchungen erkennen lassen.

Das barytalkalische Filtrat des digalakturonsauren Bariumsalzes wurde durch Einleiten von Kohlensäure von überschüssigem Barythydrat befreit und polarisierte nach dem Filtrieren im 2-dm-Rohr $\alpha_D = - 0{,}2^0$ Saccharose.

Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne verdampft und der hellgelb gefärbte Rückstand mit 85proz. Alkohol ausgekocht. Die alkoholischen Auskochungen wurden im Vakuum zur Trockne verdampft und ergaben als Rückstand ein gelbbraunes Pulver (0,57 g), das sich als ein alkohollösliches Zuckeranhydrid erwies. 0,1789 g der vakuumtrockenen Substanz in 10 ccm Wasser gelöst zeigten im 2-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D = - 0{,}8^0$. $c = 1{,}79$.

$$[\alpha]_D = - 22{,}3^0.$$

Die in Wasser gelöste Substanz reagierte neutral und gab mit *Fehling*scher Lösung versetzt in der Kälte einen weißen Niederschlag, beim Erhitzen keine Ausscheidung von Cu_2O.

5 ccm der obigen Polarisationslösung wurden in einem kleinen Kölbchen mit 5 ccm verdünnter Salzsäure 2 bis 3 Minuten gekocht. Nach dem Erkalten zeigte die Flüssigkeit im 2-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D = + 0{,}3^0$.

Die Lösung reduzierte jetzt stark *Fehling*sche Lösung.

Außerdem wurde noch ein alkoholunlösliches Zuckeranhydrid gewonnen, indem der beim Auskochen mit 85proz. Alkohol unlösliche Rückstand in wenig Wasser gelöst, filtriert und mit Alkohol gefällt wurde, worauf ein weißer feinflockiger Niederschlag ausfiel, der abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurde.

0,0954 g der vakuumtrockenen, hellgelb gefärbten Substanz in 10 ccm Wasser gelöst zeigen im 2-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D = - 1{,}04^0$.

$$[\alpha]_D = - 54{,}6^0.$$

Die in Wasser gelöste Substanz reduzierte direkt *Fehling*sche Lösung nicht, dagegen nach Kochen mit Säuren stark. Hierbei ging auch die Linksdrehung in eine Rechtsdrehung über. Der Abfall der Drehung betrug:

$$\alpha_D = - 1{,}04^0 \text{ bis } \alpha_D = + 0{,}3^0.$$

Essigsäurebestimmung in der Pektinsäure.

1,445 g im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrockneter Pektinsäure (Präparat 3, S. 314) wurden in 200 ccm Wasser gelöst und die Flüssigkeit mit Barytwasser titriert gegen Phenolphthalein als Indikator.

Verbrauch: 21 ccm n/10 Barytwasser.

1 g Pektinsäure neutralisiert demnach 14,53 ccm n/10 Baryt.

Dann wurden zu der Lösung 97,3 ccm n/10 Barytlösung im Überschuß zugegeben und die Flüssigkeit in einem verschlossenen Kolben stehengelassen. Nach 24 Stunden wurde bis zur Neutralisation zurücktitriert, und zwar mit 51,7 ccm n/10 Schwefelsäure.

Also Verbrauch in der Kälte: 45,6 ccm n/10 Barytwasser.

Zu der Lösung wurden weitere 97,3 ccm n/10 Barytlösung zugegeben und das Ganze auf dem Wasserbad am Rückflußkühler mit aufgesetztem Natronkalkrohr 6 Stunden lang erhitzt.

Beim Zurücktitrieren wurden 28,8 ccm n/10 Schwefelsäure zur Neutralisation verbraucht.

Demnach Verbrauch in der Hitze: 68,5 ccm n/10 Baryt.

Zu der Flüssigkeit wurde nun so viel verdünnte Schwefelsäure zugegeben, daß eine etwa 2proz. schwefelsaure Lösung, die mit Wasserdampf destilliert wurde. Die Destillate wurden mit n/10 Barytwasser gegen Phenolphthalein titriert:

1. Liter	Destillat	neutralisiert	16.2	ccm	n/10 Baryt
2. ,,	,,	,,	11,6	,,	,,
3. ,,	,,	,,	7,0	,,	,,
4. ,,	,,	,,	5,8	,,	,,
5. ,,	,,	,,	2,7	,,	,,
6. ,,	,,	,,	2,1	,,	,,
7. ,,	,,	,,	3,1	,,	,,
8. ,,	,,	,,	1,1	,,	,,
9. ,,	,,	,,	1,1	,,	,,

Die vereinigten Destillate wurden auf dem Wasserbad auf 200 ccm eingedampft und zur Zerstörung der Ameisensäure[1]), die durch Säureeinwirkung auf die Kohlenhydrate der Pektinsäure entstanden und durch die Wasserdampfdestillation mit der abgespaltenen Essigsäure mit überdestilliert war, eine Lösung von 9 g Kaliumbichromat und 40 g konzentrierter Schwefelsäure in 100 ccm Wasser zugegeben. Die Flüssigkeit wurde erhitzt und nochmals mit Wasserdampf destilliert.

1. Liter	Destillat	neutralisiert	21,6	ccm	n/10 Baryt
2. ,,	,,	,,	4,8	,,	,,
3. ,,	,,	,,	2,8	,,	,,
4. ,,	,,	,,	1,9	,,	,,
5. ,,	,,	,,	1,5	,,	,,
6. ,,	,,	,,	0,3	,,	,,
			32,9	ccm	n/10 Baryt

Dem entspricht eine Menge von 0,0197 g Essigsäure oder *13,6 Proz. Essigsäure in der Pektinsäure.*

[1]) *Abderhalden,* Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. 2, 23, 1910.

Bariumacetat.

Die mit Barytlösung neutralisierten Destillate wurden in einer Platinschale auf ein kleines Volumen eingedampft, filtriert und zur Trockne verdampft.

Der Rückstand, das essigsaure Barium, wurde wiederholt mit Alkohol zur Entfernung des Phenolphthaleins ausgekocht.

0,1632 g des bei 110° getrockneten Bariumacetats wurden mit Schwefelsäure abgeraucht. Erhaltenes Bariumsulfat 0,1449 g.

$(CH_3COO)_2Ba$. Ber.: 53,80 Proz. Ba
Gef: 53,33 „ Ba

Bariumsalz der Galakturonsäure.

Das durch vollkommene Hydrolyse der Pektinsäure mit 2proz. Schwefelsäure (S. 317) erhaltene *Bariumsalz der Galakturonsäure* wurde zur Reinigung in wenig Wasser gelöst und mit einem Überschuß von Alkohol wieder ausgefällt. Das in flockiger Form ausfallende Bariumsalz wurde abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen uns stellte, bei 110° getrocknet, ein schwach gelblich gefärbtes Pulver dar (5,9 g). 0,1542 g im Vakuum bei 78° über Phosphorpentoxyd getrocknetes Bariumsalz der Galakturonsäure in 10 ccm Wasser gelöst zeigen im 2-dm-Rohr die Drehung $\alpha_D^{20} = + 1{,}01°$, demnach $[\alpha]_D^{20} = + 82{,}6°$.

0,1234 g vakuumtrockenen Bariumsalzes, im Platintiegel mit Schwefelsäure verascht, hinterließen 0,0564 g $BaSO_4$.

$(C_6H_8O_7)_2Ba$. Ber.: 26,30 Proz. Ba.
Gef.: 26,90 „ Ba.

Kristallisierte d-Galakturonsäure aus Pektinsäure.

5,5 g getrocknetes Bariumsalz der Galakturonsäure wurden in 200 ccm Wasser gelöst mit so viel n/10 Schwefelsäure versetzt, daß nur geringe Mengen von Bariumionen noch in Lösung blieben. Dann wurde vom Bariumsulfat abfiltriert und die Flüssigkeit im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt. Diese eingeengte Lösung trug man in Alkohol ein, so daß eine Lösung von etwa 90 Proz. Alkoholgehalt entstand. Hierbei fiel noch eine geringe Menge Bariumsalz der Galakturonsäure in flockiger Form aus, während die freie Galakturonsäure in der alkoholischen Lösung gelöst blieb.

Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zum Sirup eingedampft. Beim Verreiben des Sirups mit 90proz. Alkohol schied sich ein flockiger Niederschlag, wahrscheinlich Reversionsprodukte, in geringer Menge ab. Die alkoholische Lösung wurde filtriert, mit Tierkohle entfärbt und nach dem nochmaligen Filtrieren zum Sirup eingedampft. Aus diesem schieden sich innerhalb 24 Stunden feine, nadelartige, wohlausgebildete Kriställchen aus. Nach weiteren 24 Stunden war der Sirup zu einer festen Kristallmasse erstarrt, die mit 93proz. Alkohol verrieben, abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen wurde. Im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, wurde rein weiße kristallisierte d-Galakturonsäure (1,1 g) erhalten.

0,1814 g der vakuumtrockenen Säure in 10 ccm Wasser gelöst, zeigen Mutarotation, und zwar als Anfangsdrehung im 2-dm-Rohr $\alpha_D^{20} = + 2{,}5°$.

$$[\alpha]_D^{20} = + 69{,}0°$$

und nach 4 Stunden die konstant bleibende Enddrehung $\alpha_D^{20} = + 1,94^0$, die sich auch nach 24 Stunden nicht änderte. Demnach

$$[\alpha]_D^{20} = + 53,55^0.$$

Der Wert stimmt sehr gut mit dem Endwert der Drehung überein, den auch *F. Ehrlich* bei Auffinden der kristallisierten d-Galakturonsäure zuerst beobachtete ($[\alpha]_D = + 53,4^0$).

0,0907 g vakuumtrockener Galakturonsäure neutralisieren gegen Phenolphthalein 4,6 ccm n/10 NaOH, 1 g Galakturonsäure demnach 50,7 ccm n/10 NaOH. Für $C_6H_{10}O_7$ ber.: 51,5 ccm n/10 NaOH.

Eine Probe der erhaltenen Galakturonsäure wurde noch einem besonderem Kristallisierverfahren unterworfen, indem man sie zunächst in etwa 30 ccm 92proz. Alkohols unter Erhitzen auf dem Wasserbade am Rückflußkühler löste.

Die etwas trübe Lösung wurde filtriert und nach dem Erkalten Äther bis zur beginnenden Trübung zugesetzt. Nach einigem Stehen schied sich ein schwach gelblich gefärbter flockiger Niederschlag in geringen Mengen aus, der abfiltriert wurde. Zu der klaren Lösung wurde ein Überschuß von Äther zugegeben.

Nach Reiben mit einem Glasstabe schied sich die Galakturonsäure in sehr reinen, glänzenden Kriställchen ab, die nach 2 Tage langem Stehen abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurden.

Elementaranalyse der vakuumtrockenen Säure 0,1245 g Substanz: 0,1686 g CO_2, 0,0555 g H_2O

für $C_6H_{10}O_7$.	Ber.:	C 37,11	H 5,15	O 57,74
	Gef.:	C 36,93	H 4,99	O 58,08

0,0518 g Galakturonsäure neutralisieren gegen Phenolphthalein als Indikator 2,7 ccm n/10 NaOH, 1 g Säure neutralisiert demnach 52,1 ccm n/10 NaOH. Für $C_6H_{12}O_7$ ber.: 51,5 ccm n/10 NaOH.

Die Galakturonsäurekristalle zeigten den Schmelzpunkt 159°, analog dem von *F. Ehrlich* gefundenen.

0,1023 g der vakuumtrockenen Galakturonsäure wurden in 10 ccm Wasser gelöst.

	$\alpha_D =$	$[\alpha]_D =$
Anfangsdrehung im 2-dm-Rohr	+ 1,6° ,	+ 78,2°
Drehung nach 5 Minuten im 2-dm-Rohr	+ 1,39°,	+ 67,94°
,, ,, 10 ,, ,, 2- ,,	+ 1,18	+ 57,65°
,, ,, 20 ,, ,, 2- ,,	+ 1,14	+ 55,73
,, ,, 50 ,, ,, 2- ,,	+ 1,11	+ 54,25
,, ,, 90 ,, ,, 2- ,,	+ 1,11	+ 54,25

Die Enddrehung beläuft sich also auf $[\alpha]_D^{20} = + 54,2^0$

Oxydation der Galakturonsäure mit Brom in der Kälte.

0,3574 g vakuumtrockener Galakturonsäure wurden in einer Stöpselflasche in 30 ccm Wasser gelöst und in die Lösung 4 ccm Brom eingetragen. Unter öfterem Umschütteln wurde die Flüssigkeit 9 Tage lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach 2 Tagen schied sich bereits *Schleimsäure* in schön ausgebildeten Prismen kristallinisch aus. Nach 9 Tagen wurde die Lösung mit dem Brom in eine Waschflasche übergespült und mittels Absaugens durch Luft das Brom weggetrieben. Hiernach wurde die Flüssig-

keit auf ein kleines Volumen eingedampft, woraus sich nach dem Erkalten größere Mengen Schleimsäure abschieden, die auf einem gewogenen Goochtiegel abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser nachgewaschen und bei 110° getrocknet wurden.

Erhalten: 0,2625 g Schleimsäure.

Da aus 0,3574 g Galakturonsäure theoretisch 0,3869 g Schleimsäure zu erwarten wären, beträgt die Ausbeute in diesem Falle 67,9 Proz. der Theorie.

0,0929 g bei 110° getrockneter Schleimsäure neutralisieren 8,9 ccm n/10 NaOH, 1 g Schleimsäure demnach 95,80 ccm n/10 NaOH. Für $C_6H_{10}O_8$ ber.: 95,26 ccm n/10 NaOH.

Der Schmelzpunkt der Schleimsäurekristalle wurde zu 213° gefunden. *Tollens*[1]) gibt ebenfalls 213° an.

Das Filtrat der Schleimsäurekristalle zeigte noch eine schwache Rechtsdrehung und gab deutlich die Orcin- und Naphthoresorcinreaktion, enthielt also vermutlich noch unoxydierte Galakturonsäure.

---

[1]) *Tollens*, Handb. d. Kohlenhydrate 1914, S. 301.

Vermehrte Milchsäureausscheidung durch den Harn bei der Avitaminose als Beweis für die Störung des Kohlehydratstoffwechsels und die Beeinflussung dieser Milchsäureausscheidung durch Insulin.

Von

Lily Rosenwald.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. September 1925.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Im Laufe ihrer Untersuchungen über den Stoffwechsel bei der Avitaminose fanden *A. Bickel* (1) (16) und seine Mitarbeiter:

1. daß der Körper der avitaminösen Tiere trotz reicher und sogar überreicher Nahrungszufuhr und praktisch quantitativer Resorption der gemischten Nahrung progressiv abmagert;

2. daß im Gegensatz zu diesem gesteigerten Umsatz der Sauerstoffverbrauch, gemessen am Gaswechsel, leicht abnimmt;

3. daß ein Teil des Kohlenstoffs, der in der Norm den Körper als Kohlensäure durch die Lungen verläßt, bei der Avitaminose durch die Nieren mit dem Harn als „dysoxydabler Kohlenstoff" ausgeschieden wird, was zu einer leichten Steigerung des Quotienten C/N im Harne führt. (Bei der Avitaminose wird also mehr stickstofffreies Material umgesetzt als in der Norm, neben einer Steigerung des Umsatzes von stickstoffhaltigem Material.)

Bickel (1) kommt auf Grund dieser Feststellungen zu dem Schluß, daß es in der Tat einen „inneren Hunger" geben muß, wie es von *Chossat* (2) zum erstenmal vermutet wurde, bei welchem der Körper, die Gewebe, nicht die Fähigkeit besitzen, eine ausreichende, quantitativ

resorbierte Nahrung intermediär zu bearbeiten, zu assimilieren, deren Energiegehalt sich voll nutzbar zu machen.

Der Gewichtsverlust der avitaminösen Versuchstiere beruht in erster Linie auf Einschmelzung der Fettdepots. Aber auch die Kohlehydratreserven werden eingeschmolzen, denn die Leber der Tiere verarmt an Glykogen. Der ganze Körper verliert sein Fett, worauf die großartige Abmagerung der Tiere in erster Linie zurückzuführen ist. Die Eiweißverluste sind geringer, denn die Negativität des Stickstoffwechsels ist unerheblich. In den Intermediärstoffwechsel gelangen also nicht nur die Nahrungsbestandteile, bestehend aus Fett, Kohlehydraten und Eiweißstoffen, hinein, sondern auch die körpereigenen, mobilisierten Fette, Kohlehydrate und Eiweißstoffe; an den Verbrennungen nehmen aber die Kohlehydrate immer weniger teil, was aus dem Sinken des respiratorischen Quotienten zu schließen ist. Das reimt sich mit der Tatsache gut, daß bei der Avitaminose im Harne unoxydierte stickstofffreie oder sehr stickstoffarme Kohlenstoffverbindungen vermehrt ausgeschieden werden, deren Natur man zwar noch nicht kennt, aber von denen man vermuten kann, daß sie dem Kohlehydratstoffwechsel angehören [*A. Bickel* (16).]

Die Arbeiten von *Morinaka* (3) aus dem *Bickel*schen Laboratorium haben gezeigt, daß die flüchtigen Fettsäuren im Harne nicht vermehrt sind. *Händel* (4) fand auch keine Vermehrung der Acetonkörper, der β-Oxybuttersäure im Harne avitaminöser Tiere, keine Ketonurie, keine Acidosis. Die Stoffwechselstörung kann also weder im Eiweiß noch im Fettstoffwechsel gesucht werden. So kam *A. Bickel* auf die Vermutung, die Störung müsse auf einer unvollkommenen Oxydation der Kohlehydrate beruhen, und der „dysoxydable Kohlenstoff“ müsse diesen oder ihren Abbauprodukten angehören.

Nun wurde die Frage aufgeworfen, in welcher Phase der Kohlehydratstoffwechsel gestört sei, d. h. auf welcher Stufe des Kohlehydratumsatzes eine Unterbrechung oder Störung stattfindet, welchen intermediären Stoffen des Kohlehydratabbaues bzw. der Kohlehydratsynthese (diese beiden sind ja eng miteinander verbunden!) der vermehrte dysoxydable Harnkohlenstoff angehörte? Das Verhalten des respiratorischen Gaswechsels, die Verminderung der Sauerstoffaufnahme ließ darauf schließen, daß die Störung den oxydativen, den aeroben Teil des Kohlehydratstoffwechsels betrifft. Wenn diese Annahme richtig war und die erste Phase des Zuckerabbaues, die anaerobe Phase: die Glykolyse, ungestört verlief, dann mußten die Endprodukte dieser Glykolyse im Körper eine Vermehrung erfahren. Als „Endprodukte“ können wir aber bloß die Nebenprodukte betrachten. Ein Blick auf das folgende Schema [aus *Neubergs* (5): Der Zucker-

umsatz der Zelle] zeigt uns, welche Stoffe wir hier in Betracht ziehen müssen.

α) $C_6H_{12}O_6 - 2\,H_2O = C_6H_8O_4$ (Methylglyoxal-aldol).

β) $C_6H_8O_4 = 2\,CH_2{:}C(OH).CHO$ bzw. $2\,CH_3.CO.COH$ (Methylglyoxal).

γ)
$$\begin{array}{l} CH_2{:}C(OH).COH + H_2O + \overset{\displaystyle H_2}{\underset{\displaystyle O}{|}} \\ CH_2{:}C(OH).COH \end{array} = \begin{array}{l} CH.OH.CHOH.CH_2OH \text{ (Glycerin)} + \\ CH_2{:}C(OH).COOH \text{ bzw. } CH_3.CO.COOH \\ \text{(Brenztraubensäure).} \end{array}$$

δ) $CH_3.CO.COOH = CO_2 + CH_3.COH$ (Acetaldehyd).

ε)
$$\begin{array}{l} CH_3.CO.COH \\ CH_3.COH \end{array} + \begin{array}{c} O \\ | \\ H_2 \end{array} = \begin{array}{l} CH_3.CO.COOH \text{ (Brenztraubensäure)} \\ CH_3.CH_2OH \text{ (Äthylalkohol)} \end{array}$$

Als Nebenprodukte entstehen also Glycerin + Acetaldehyd in kleinen Mengen. Die Brenztraubensäure wird gebildet, um wiederum zu Kohlenoxyd und Acetaldehyd zu zerfallen. Die Entstehung der Milchsäure fügt sich ungezwungen diesem Schema ein, wenn man annimmt, daß ein kleiner Teil des Methylglyoxals durch eine innere Dismutation zu weiter nicht angreifbarer Milchsäure „*stabilisiert*“ wird:

$$\begin{array}{l} CH_3.CO \\ COH \end{array} + \begin{array}{c} H_2 \\ | \\ O \end{array} = \begin{array}{l} CH_3.CHOH \\ \quad\;\; | \\ \quad COOH \text{ (Milchsäure),} \end{array}$$

wie *Neuberg* den Vorgang auf Grund der von ihm aufgefundenen, das Methylglyoxal hydralisierenden Fermente nennt. [Vgl. *Neuberg* (5): Der Zuckerumsatz der Zelle].

Die Milchsäure wird also auf anaerobem, rein fermentativem Wege glykolytisch nicht weiter abgebaut; hier muß die oxydative Phase des Zuckerstoffwechsels einsetzen.

Gerade diese oxydative Phase schien aber bei der Avitaminose unvollständig zu verlaufen (s. das über den Gaswechsel Gesagte). Von einem eigentlichen Sauerstoffmangel kann nicht die Rede sein, da der Luftsauerstoff den Geweben des Organismus bei der Avitaminose zur freien Verfügung steht. Es liegt an den Geweben, diesen in genügendem Maße auszunutzen. Die Respirationsversuche hatten gezeigt, daß jene dazu nicht fähig waren. Es lag offenbar ein innerer Sauerstoffmangel vor, ein Sauerstoffmangel der Gewebe, bedingt durch die Unfähigkeit der Gewebselemente, den Sauerstoff, der ihnen zugeführt wurde, in ausreichender Weise auszunutzen. Nichts aber sprach für eine gestörte Glykolyse; im Gegenteil sprach die Verarmung des Körpers an Glykogen für eine reichliche Mobilisation von Kohlehydraten. Es lag also die Annahme nahe, daß 1. bei der Avitaminose der oxydative Teil des Kohlehydratstoffwechsels gestört war, wobei die Glykolyse

im wesentlichen normal verlief, daß 2. bei der Reversibilität der Hauptreaktionen (Abbau und Aufbau) die Störung chemisch bloß an den Nebenprodukten faßbar sein würde und man gewissermaßen als Indikator für diese Störung im Hauptverkehr eine Stauung in den Nebenstraßen, eine vermehrte Milchsäureproduktion erwarten dürfte.

Ich habe daher den Milchsäuregehalt des Harnes avitaminöser Hunde geprüft und dabei eine beträchtliche Erhöhung desselben gefunden.

Die Milchsäurebestimmungen sind nach der Methode von *Fürth-Charnass* (6) gemacht, wobei die Milchsäure in schwefelsaurer Lösung mit Kaliumpermanganat zu Acetaldehyd oxydiert wird. Der Acetaldehyd wird in einer Vorlage von Kaliumbisulfit von bekanntem Jodwert aufgefangen und durch Rücktitration jodometrisch bestimmt (näheres siehe *Fürth-Charnass*, diese Zeitschr. **26**, 199, 1910).

Hund 1 wurde durch eine auf sein Anfangskörpergewicht berechnete, kalorisch ausreichende tägliche Nahrung, bestehend aus 40 g Reis, 25 g Weizeneiweiß, 15 g Schweinefett, 1,5 g Salzgemisch, vom 19. Mai 1925 an avitaminös ernährt und im frühen Stadium der Avitaminose untersucht. Aus der Tabelle I sowie aus der Ausscheidungskurve (Abb. 1) ist ersichtlich,

Tabelle I. Hund 1 (Anfangsstadium der Avitaminose).

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Absolute Milchsäuremenge mg	Milchsäure-konzentration mg-Proz.	Bemerkungen
1925					
19. V	6250	260	17,1	6,6	
20. V	6250	330	20,8	6,3	
6. VI.	5700	385	108,6	28,2	
7. VI.	5600	380	105,5	27,7	Insulin subkutan
8. VI.	5660	—	—	—	Insulin subkutan
9. VI.	5600	420	132,2	31,4	
10. VI.	5600	325	81,0	25,0	
11. VI.	5570	408	114,0	27,9	
12. VI.	5600	282	98,9	35,0	

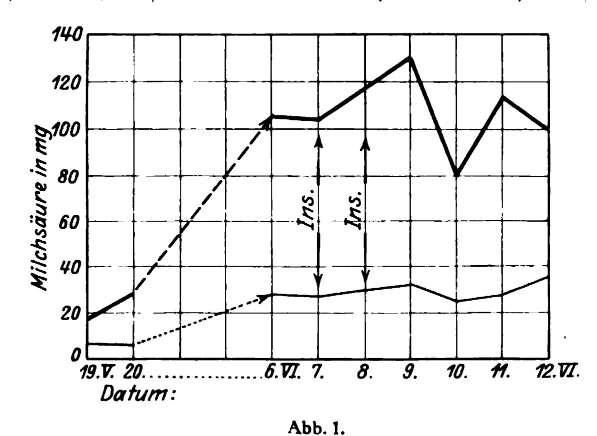


Abb. 1.
——— Absolute Milchsäuremenge.
——— Proz. Konzentration der Milchsäure.

daß die absoluten Milchsäuremengen im Tagesharn von 17,1 bis 20,8 mg nach 2 Wochen auf 108,6 bis 105,5 mg gestiegen sind. Die Milchsäurekonzentration (d. h. die auf 100 ccm Harn berechnete Milchsäuremenge), die zu Anfang der avitaminösen Ernährung 6,6 bis 6,3 mg-Proz. betrug, stieg in derselben Zeit auf 28,2 bis 27,7 mg-Proz. an. Die Kurve der Konzentration zeigt also einen gewissen Parallelismus mit der der Tagesausscheidungen.

Es wurde bei dem Hunde weiter die Wirkung des Insulins geprüft, da in Parallelversuchen an einem anderen Hunde von *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* (17) gefunden worden war, daß die Ausscheidung des dysoxydabeln Kohlenstoffs bei der Avitaminose durch Insulin vermindert wurde. Ein Blick auf die Kurve (Abb. 1) zeigt uns, daß auch die Milchsäureausscheidung durch Insulin abnimmt, um nach Aufhören der Insulinwirkung wieder zuzunehmen. Auffallend ist, daß die Abnahme der Milchsäureausscheidung erst am zweiten Tage nach der letzten Insulininjektion zustande kommt.

Hund 2 zeigte uns ein ähnliches Verhalten. Dieser bekam als tägliche Nahrung 40 g Reis, 35 g Weizeneiweiß, 15 g Schweinefett und 1,5 g Osborne-Salzgemisch. Wir finden in frühen Stadien der Avitaminose Milchsäurewerte von 35 bis 40,7 mg im Tagesharn. Dementsprechend finden wir Konzentrationen von im Mittel 4,5 mg-Proz. Nach 3 Monaten, also im Stadium der schweren Avitaminose finden wir 81,9 bis 115,2 bis 185,6 mg absolute Tagesmengen und die Konzentrationen auf 21,0 bis 36,0 bis 40,3 mg-Proz. gestiegen (siehe Tabelle II und Kurve Abb. 2); auch hier macht die Kurve der Konzentrationen die Bewegungen der Kurve der absoluten Werte mit geringerer Amplitude mit. Auch in diesem Versuche finden wir nach subkutaner Injektion von Insulin einen Abfall der ausgeschiedenen Milchsäuremengen von 185,6 bis auf 68,8 mg, um dann, nach Aufhören der Insulinwirkung, wieder auf 143,4 bzw. 168,0 mg (absolut) zu steigen. Auch hier erfolgt Abnahme der Konzentration nach Insulin.

Tabelle II.

Hund 2. (Tiefe Avitaminose.)

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Absolute Milchsäuremenge mg	Milchsäurekonzentration mg-Proz.	C:N	Bemerkungen
1925						
10. III.	6000	610	35,0	5,7	0,49	
11. III.	5900	350	35,0	1,0	0,49	
20. III.	6000	870	46,7	5,3	0,62	
21. III.	6030	770	46,7	6,0	0,62	
2. VI.	4930	390	81,9	21,0	1,10	
3. VI.	4900	320	115,2	36,0	1,10	
4. VI.	4700	460	185,6	40,3	0,49	Insulin 5 Eiheiten
5. VI.	4650	377	150,8	40,0	0,35	
6. VI.	4550	415	68,8	16,5	—	
7. VI.	—	—	—	—	—	Durchfall
8. VI.	4500	685	143,4	20,9	—	
9. VI.	4550	375	168,0	44,8	—	

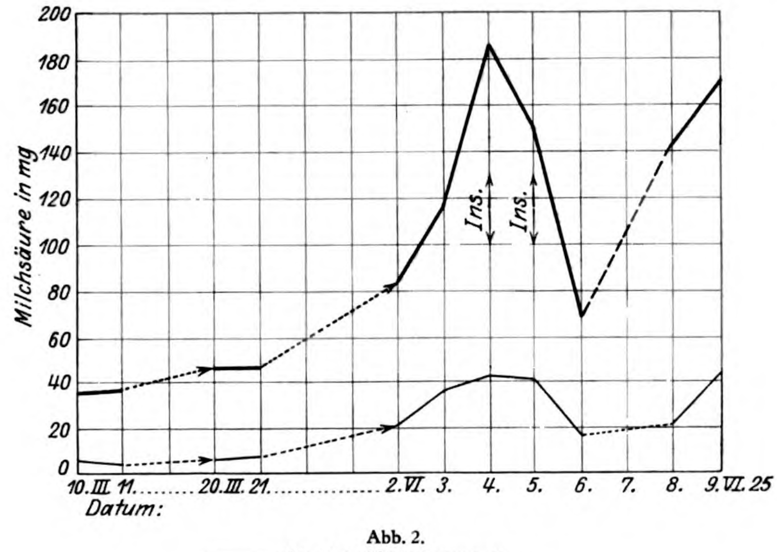


Abb. 2.
——— Absolute Milchsäuremenge.
——— Proz. Konzentration der Milchsäure.

Um zu prüfen, ob es sich nicht um Zufallsbefunde bei der Insulinwirkung gehandelt hat, wurde nun bei demselben Hunde nach 5 Tagen der Insulinversuch wiederholt (s. Tabelle III und Abb. 3).

Tabelle III.

Hund 2. (Tiefe Avitaminose.)

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Absolute Milchsäuremenge mg	Milchsäurekonzentration mg-Proz.	Bemerkungen
1925					
14. VI.	4520	340	111,0	35,5	
15. VI.	4500	360	160,0	44,5	Insulin 5 Einheiten
16. VI.	4500	690	192,0	22,1	
17. VI.	4500	410	86,4	21,0	
18. VI.	4500	540	166,2	30,7	
19. VI.	4470	445	162,2	36,4	
20. VI.	4500	490	152,7	31,1	

Auch hier finden wir das bisherige Verhalten; von 192,7 mg erfolgte ein Absturz auf 86,4 mg nach Darreichung von Insulin, um dann wieder, nach Aufhören der Insulinwirkung, bis auf Werte von 166,2 mg anzusteigen. Die Kurve der Konzentration zeigt den gewohnten Parallelismus mit geringerer Amplitude. Die Kurven der beiden Versuche zeigen im Prinzip ein gleiches Verhalten; die Auswirkung des Insulins auf die Milchsäureausscheidung tritt zögernd ein; die Senkung des Quotienten C : N durch Insulin kann schon früher da sein, am Insulintage selbst, während die Verminderung der Milchsäureausscheidung erst am folgenden bzw. zweit-

folgenden Tage deutlich wird. Das beweist auch, daß die Quotienterhöhung mit der Milchsäureausscheidung wenig zu tun hat. Es kann sich bei den Beobachtungen an der Milchsäure nicht um Zufallsbefunde handeln, da alle Versuche das gleiche Ergebnis lieferten.

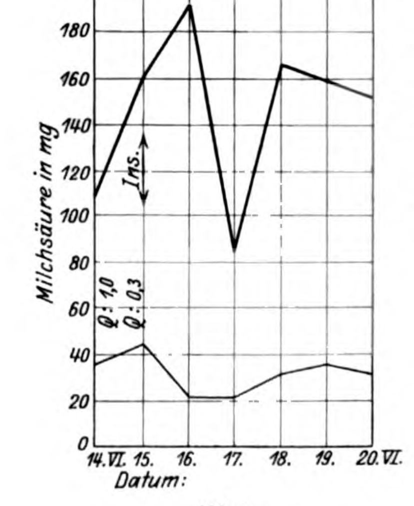


Abb. 3.
Hund 2. (Tiefe Avitaminose.)
—— Absolute Milchsäuremenge.
- - — Proz. Konzentration der Milchsäure.

Tabelle IV und Abb. 4 zeigen noch die Versuche an einem Hunde 3, der bei relativ reichlicher Kohlehydratnahrung ohne Fettzulage, aber durch Orangesaftzugabe partiell vitaminhaltig ernährt war. Der Hund wurde bei einem Gewicht von annähernd 4000 g mit 45 g Reis, 25 g Weizeneiweiß, 1 g Salzgemisch, 60 ccm Orangensaft ernährt.

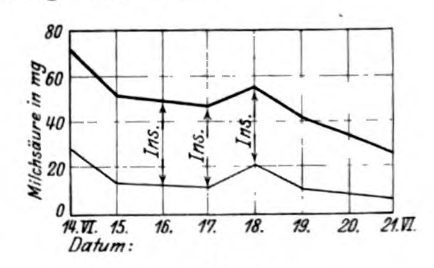


Abb. 4.
—— Absolute Milchsäuremenge.
—— Proz. Konzentration der Milchsäure.

Tabelle IV. Hund 3. (Fütterung ohne Faktor A.)

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Absolute Milchsäuremenge mg	Milchsäurekonzentration mg-Proz.	Bemerkungen
1925					
14. VI.	3850	250	73,7	29,5	
15. VI.	3720	385	53,9	14,0	
16. VI.	3800	340	—	—	Insulin 2 Einheiten
17. VI.	3750	370	48,1	13,0	„ 4 „
18. VI.	3770	260	54,6	21,0	„ 4 „
19. VI.	3800	365	43,8	12,0	
20. VI.	—	—	—	—	
21. VI.	3700	445	26,7	6,0	

Wir finden hier schon im Anfang der Fütterung etwas höhere Milchsäurewerte als bei den anderen Hunden, was auf die reichere Kohlehydratzufuhr zurückzuführen sein wird. Wir sehen außerdem, daß die nicht aufsteigende Kurve der Milchsäureausscheidung durch drei Insulintage nur eine ganz schwach absteigende Tendenz bekommen hat.

Dieser Versuch zeigt erstens, daß das Fehlen des Faktors A keinen Einfluß auf die Milchsäureausscheidung bei einem nur mit den Faktoren B und C ernährten Hunde hat, zweitens, daß auf die normale

Milchsäureausscheidung das Insulin höchstens einen ganz abgeschwächten Einfluß hat. Zugleich zeigt auch dieser Versuch in Verbindung mit den bekannten Beziehungen des B-Faktors zum Kohlehydratstoffwechsel (Beobachtungen an Tauben), daß Anwesenheit des B-Faktors die pathologische Milchsäureausscheidung durch den Harn verhindert. Das Verhalten der Milchsäure im Harne avitaminöser Tiere zeigt einen auffallenden Parallelismus mit dem Verhalten des „dysoxydablen Kohlenstoffs“ überhaupt. Die Milchsäureausscheidung steigt im Verlaufe der Avitaminose beträchtlich an und reagiert auf Insulindarreichung mit einer vorübergehenden Abnahme, genau wie der dysoxydable Kohlenstoff, wenn auch zeitlich etwas zögernder als die Hauptmasse desselben. Auch aus anderen Gründen sind wir nicht berechtigt, die Milchsäure mit dem dysoxydablen Kohlenstoff schlechthin zu identifizieren, da die absoluten Mengen der Milchsäure zu gering sind, um die erhöhten Werte des dysoxydablen Kohlenstoffs ganz zu liefern. (Selbst wenn wir etwaige Fehler der Methodik mit 100 Proz. in Anrechnung brächten, würden die gefundenen absoluten Milchsäurewerte zu klein sein, um das Phänomen des erhöhten Quotienten ganz zu erklären, trotz der starken relativen Vermehrung.) Man kann daraus den Schluß ziehen, daß die Milchsäure zwar einen Teil des dysoxydablen Kohlenstoffs ausmacht, daß man aber annehmen muß, daß neben ihr noch andere Zeischenprodukte des Kohlehydratstoffwechsels in vermehrter Menge zur Ausscheidung gelangen, die auch prompter als die pathologische Milchsäureausscheidung durch Insulin redressiert werden. Die Vermehrung der Milchsäure dient als Indikator dafür, daß bei der Avitaminose in der Tat der *Kohlehydratstoffwechsel* eine Störung erlitten hat. Die Beziehungen der Milchsäure zum Kohlehydratstoffwechsel sind bekannt [*O. Fürth* (6)]. Das Reagieren auf Insulin kann ebenfalls als Beweis dafür betrachtet werden, daß die Störung im Kohlehydratumsatz liegt, denn wie vom Diabetes her bekannt ist, greift das Insulin eben doch vorzüglich in den Kohlehydratstoffwechsel ein. Wir können aber noch weitergehende Schlüsse auf die *Art der Störung* ziehen. Es ist die Annahme bestätigt, daß bei der Avitaminose der oxydative Anteil des Zuckerstoffwechsels gestört ist. Es handelt sich offenbar um eine Störung, die in die Gewebe lokalisiert werden muß, um einen inneren Sauerstoffmangel der Gewebe, wobei die unvollständig verbrannten Kohlenstoffverbindungen im Harne zutage treten, und die in ihnen enthaltenen chemischen Energien für den Körper verloren gehen. Diese andauernden Defizite sind es, die zu der Verelendung des Körpers führen. Wir bekommen auf diese Weise eine neue Auffassung von der Kachexie im allgemeinen, wodurch sie auch bedingt sein mag.

Wir finden in der Literatur viele Hinweise auf das Auftreten von Milchsäure im Harne bei Vergiftungen. *T. Araki* (7) fand sie im Harne von Tieren,

die er eine Zeitlang Kohlenoxyd atmen ließ. Er nimmt dabei an, daß das Auftreten von abnormen Bestandteilen im Harne bei der CO-Vergiftung auf Einwirkung des dabei stattgefundenen *Sauerstoffmangels* zurückzuführen ist, und daß Kohlenoxydvergiftung nichts anderes ist, als allmähliche Sauerstoffentziehung aus dem Organismus. Hier handelt es sich um eine Störung des Sauerstoffträgers: des Blutes, da der an CO gebundene Teil des Hämoglobins an der Sauerstoffaufnahme aus der Alveolarluft gehindert ist. Man könnte auch annehmen, daß eine spezifische Giftwirkung des Kohlenoxyds zu den abnormen Stoffwechselprodukten geführt hat; deshalb hatte *Araki* versucht, einen rein äußeren, mechanischen Sauerstoffmangel herbeizuführen, indem er in einer Luft atmen ließ, der er allmählich mechanisch den Sauerstoff immer mehr entzog. Es trat vermehrte Milchsäureausscheidung im Harne auf. Damit war seine Annahme bei der CO-Vergiftung bewiesen.

Bei der Strychninvergiftung von Fröschen fand *Marcuse* (8) im Harne Milchsäure und hat es so gedeutet, daß der Strychnintetanus an der vermehrten Milchsäureausscheidung schuld sei. Die Untersuchungen von *Spiro* (9) über die Milchsäureausscheidung im Harne bei Menschen mit starker Muskeltätigkeit und über die Milchsäure im Blute von Tieren, deren Muskel einige Zeit im Tetanus erhalten waren, schienen dieser Deutung besonders günstig. Strychnintetanus führt aber stets eine Störung der Respiration herbei, und es ist also bei Vergiftung mit Strychnin die starke Tätigkeit der Muskeln mit ungenügender Sauerstoffzufuhr kombiniert.

Der Versuch, die Milchsäurevermehrung bei der Giftwirkung durch vermehrte Muskeltätigkeit erklären zu wollen, versagt aber vollkommen bei der Curarevergiftung (*Araki*), bei welcher die Muskeln in möglichster Ruhe verharren. *Araki* fand nämlich bei der Vergiftung mit Curare und mit Strychnin bei Hühnern, Kaninchen und Hunden ebenfalls vermehrte Lactacidurie. *Cl. Bernard* (10) hat bei Curarevergiftung auch Glykosurie gefunden; *L. Senff* (11) hat durch CO-Atmung Diabetes erzeugt. Offenbar haben die genannten Autoren mit größeren Giftdosen gearbeitet, was zu einer tiefer gehenden Störung geführt hat. Es kam gar nicht bis zu den Abbauprodukten; die Störung der Zellfunktion konnte eine so hochgradige sein, daß letztere nicht einmal ausreichte, um hochwertigen Verbindungen, wie dem Traubenzucker, wenigstens einen Teil der in ihnen enthaltenen chemischen Energie abzugewinnen: der Körper verlor ihn im ganzen.

Araki (7) hat schon die Vermutung ausgesprochen (S. 370), daß *schwächerer Sauerstoffmangel* nur zur *Milchsäureausscheidung* führt, und daß *Zucker* erst bei *hochgradigem Sauerstoffmangel* auftritt.

Durch die Analogie in dem Verhalten der Milchsäure bei Zuständen von Sauerstoffmangel und bei der Avitaminose ist man geneigt, dies auf die Avitaminose zu übertragen. Demnach würde die Hauptstörung des avitaminösen Stoffwechsels in einem *Sauerstoffmangel mäßigeren Grades liegen,* wobei die Gewebe die Fähigkeit verloren haben, den ihnen zur Verfügung gestellten Sauerstoff in genügendem Umfange aufzunehmen.

Interessant sind noch, wegen der Ähnlichkeit mit diesem Verhalten, die Befunde von vermehrter Milchsäureausscheidung bei der Abkühlung von Säugetieren.

Araki (7) hatte diese Versuche an Säugetieren durch Bedecken mit Schnee oder Eintauchen in Eiswasser ausgeführt. Ebenso interessant muß es sein, zu hören, daß *Quinquaud* (13) bei abgekühlten Tieren eine hochgradige Sauerstoffanreicherung im Blute fand, die auf eine Herabsetzung der Verbrennungsvorgänge in den Geweben zurückgeführt wurde. *Spiro* fand bei Abkühlung eine Erhöhung des Quotienten C/N (siehe *Spiro* in *Neuberg*: Der Harn) ähnlich der Avitaminose. *Arnoldi* fand, daß vielfach bei Patienten mit verschiedenen Krankheitszuständen, bei denen der Harnquotient C/N hoch war, der Gaswechsel niedrig lag, und daß durch Insulin mit der Senkung des Quotienten der Gaswechsel in die Höhe ging. Es handelt sich hier um die Fälle, auf die *Bickel* in seinem Vortrage über Vitamine, Avitaminose und dysoxydative Carbonurie hingewiesen hat (16). Die Tatsache scheint dieselbe Bedeutung zu haben, wie der Befund von *Quinquaud* (13) über die Sauerstoffrückstauung im Blute bei der Abkühlung. *A. Fränkel* (14) fand ferner in Versuchen an Warmblütern, in denen die Versuchstiere entweder mit Kohlenoxyd vergiftet waren, oder der Sauerstoffmangel durch Verengerung der Trachealfistel, durch welche die Tiere atmeten, herbeigeführt war, eine Steigerung der Harnstoffausscheidung, die als Ausdruck einer gesteigerten Stickstoffausscheidung betrachtet werden konnte. Man konnte annehmen, daß der vermehrte Stickstoff im Harne Ammoniak angehören konnte, welches vermehrt ausgeschieden wurde, um die bei dem Sauerstoffmangel auftretende vermehrte Milchsäure zu neutralisieren. Einige Versuche, die von *Araki* angestellt worden waren, zeigten also tatsächlich eine Zunahme des Ammoniakgehaltes im Harne bei dem Vergleiche des Ammoniakgehaltes vor und nach der Herstellung des Sauerstoffmangels.

Auf die Bedeutung des Insulins soll hier nur ganz kurz und nur im Zusammenhang mit der Milchsäureausscheidung eingegangen werden. Wir haben gesehen, daß die Milchsäureausscheidung durch Insulindarreichung vermindert werden konnte. Wenn *Embden* (15) recht hat, indem er behauptet, „in der Milchsäure wäre noch bei weitem die Hauptmenge chemischer Energie vorhanden, die im Traubenzucker steckt“, dann bedeutet die Verminderung der Milchsäureausscheidung durch das Insulin eine erhebliche Ersparnis für den Organismus. Leider hat das Insulin eine sehr vorübergehende Wirkung.

Zusammenfassend kann man die Resultate dieser Arbeit in folgenden Sätzen ausdrücken:

1. Bei der Avitaminose findet sich eine relativ vermehrte Milchsäureausscheidung durch den Harn.

2. Die Milchsäure bildet bloß einen Teil des bei dieser Krankheit gesteigerten dysoxydablen Harnkohlenstoffs, weil die absoluten Milchsäuremengen nicht ausreichen, um den gesamten erhöhten dysoxydablen Kohlenstoff zu liefern.

3. Die vermehrte Milchsäureausscheidung geht auf Darreichung von Insulin auf geringere Werte zurück, um nach Aufhören der Insulinwirkung wieder anzusteigen.

Aus den Befunden lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

a) Die Stoffwechselstörung betrifft bei der Avitaminose vorwiegend den Kohlehydratstoffwechsel.

b) Es liegt eine Störung der oxydativen Phase des Kohlehydratstoffwechsels vor; ein „innerer“ Sauerstoffmangel.

Zum Schluß will ich noch darauf hinweisen, daß unabhängig von mir Herr Dr. *Collazo*, wie ich von ihm hörte, im Laboratorium für experimentelle Pathologie in Paris (Prof. *Labbé*) ebenfalls bei avitaminösen Tieren die Milchsäurevermehrung im Harne und außerdem auch im Blute gefunden hat. Durch diese Bestätigung meiner Versuchsresultate wird deren Beweiskraft noch weiter gehoben. [*Anmerkung bei der Korrektur:* Eine kurze Mitteilung von *Collazo* über seine Versuche ist inzwischen erschienen (18)].

Literatur.

1) *A. Bickel*, Experimenteller Beweis für das Vorkommen „inneren Hungers“, Klin. Wochenschr., 4. Jahrg., Nr. 12. — 2) *Chossat*, Recherches experiment. sur l'ination, Paris 1843, zitiert nach *Bickel*. — 3) *Morinaka*, diese Zeitschr. **138**, 1923. — 4) *Händel*, ebendaselbst **144**, 1924. — 5) *C. Neuberg*, Der Zuckerumsatz der Zelle, in *Oppenheimer*, Handb. d. Biochem., Erg.-Bd. **1913**, S. 569 bis 609 u. 2. Aufl. Band II, S. 459, 1924. — 6) *Fürth-Charnass*, diese Zeitschr. **26**, 199, 1910. — 7) *T. Araki*, Über die Bildung von Milchsäure und Glykose im Organismus bei Sauerstoffmangel, Zeitschr. f. physiol. Chem. **15**, 453, 1891. — 8) *Markuse*, Pflügers Arch. **39**, 425. — 9) *Spiro*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**, 111. — 10) *Cl. Bernard*, Leçon sur le diabète et la Glykosurie animale. Paris 1877. — 11) *L. Senff*, Über den Diabetes nach Kohlenoxydatmung. Dorpat 1869. — 12) *T. Araki*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**, 453, 1882. — 13) *Quinquaud*, Journ. de l'anat. et de la physiol. **24**, 326, 1887. — 14) *A. Fränkel*, Virchows Arch. **67**, 273. — 15) *Embden*, diese Zeitschrift **45**, 45, 1912. — 16) *A. Bickel*, Das Wesen der Avitaminose, ebendaselbst **146**, 1924; Vitamine und Avitaminose und die dysoxydative Carbonurie, Medizinische Klinik 1925, Nr. 29; Zur Kohlenstoffbilanz bei der Avitaminose. Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 46. — 17) A. *Bickel* und *O. Kauffmann-Cosla*, Über das Wesen und die Beeinflussung aglykosurischer Stoffwechselstörungen der N-freien kohlenstoffhaltigen Substanz durch Insulin. Ebendaselbst 1925, Nr. 25. — 18) *Collazo*, Zur Pathogenese der dysoxydativen Carbonurie. Deutsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 39.

Die Oberflächenspannung des Blutserums unter normalen und pathologischen Bedingungen, besonders bei der Lungentuberkulose.

Von

Walter Sauer.

(Aus der inneren Abteilung des Krankenhauses Lankwitz.)

(Eingegangen am 30. November 1925.)

Neue therapeutische Versuche bei der Lungentuberkulose brachten uns auf die Vermutung, daß es sich bei dieser Krankheit um einen Prozeß handele, der mit Erhöhung der sonst konstanten Oberflächenspannung einhergehe. Auf Veranlassung von Prof. *Zuelzer* unternahm ich es, die Oberflächenspannung des Blutserums im normalen und krankhaften Zustande, besonders bei Tuberkulosen, zu untersuchen.

Zur Bestimmung der Oberfl.-Sp. (= Oberflächenspannung) sind verschiedene Methoden angegeben worden, deren Ergebnisse aber stark voneinander abweichen.

Traube fand mit dem Stalagmometer 6,42 mg/mm; *Fano-Mayer* mit der Blasendruckmethode 58,2 bis 59,9 Dyn/cm bei 39° C. Von *Morgan* und *Woodward* wurden mit der Tropfengewichtsmethode 44,3 bis 46,4 Dyn/cm angegeben. *Du Noüy*[1]) stellte als Normalwert mit seiner Ringmethode 55,5 bis 55,6 Dyn/cm bei 25° C fest.

Diese Methoden sind alle etwas umständlich und zeitraubend, so daß wir uns nach einer einfachen, schnell auszuführenden, aber doch für unsere Untersuchungen genügend genauen Methode umsahen. Wir glauben, daß diesem Zwecke vollkommen die von *R. Brinkman* und Fräulein *van Dam*[2]) angegebene Adhäsionsmethode entspricht.

Die Bestimmung geschieht mittels eines kleinen, flachen, horizontal hängenden Platinringes; zur Wägung dient die *Braun-Hartmann*sche Torsionswage, die ein Ablesen von 1 mg hinreichend genau gestattet. Man hängt den Ring an das Wagehäkchen und stellt das Torsionsgleichgewicht ein. Das zu untersuchende Serum befindet sich in einem Uhrschälchen auf einem Schraubenstativ. Das Stativ wird so eingestellt, daß der Platinring

---

[1]) *Du Noüy*, Journ. of exper. Med. 35, 1922.

[2]) *R. Brinkman* und Frl. *van Dam*, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 48.

gerade die Serumoberfläche berührt; dann wird die Torsionsgröße bestimmt, die den Ring gerade losreißen kann (K); nach Entfernung des Uhrschälchens bestimmt man das Gewicht des Ringes + anhaftender Flüssigkeit (G). Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$\frac{K - G}{L} \times 0{,}981.$$

Der Wert L ist eine für jeden Ring bestimmte Konstante. Zu beachten ist, daß das nüchtern zu entnehmende Serum vor der Bestimmung 30 Minuten in der Schale stehen muß, da dann erst Oberflächengleichgewicht herrscht, worauf erst kürzlich *Tominaga*[1]) hingewiesen hat. Daß die Schälchen und Gläser fettfrei und der Platinring durch Ausglühen sauber zu halten sind, bedarf keiner besonderen Erwähnung. Bei Frauen ist auf die Menses zu achten, da zu der Zeit Veränderungen der Werte auftreten [*Tagakoro*[2])].

Unsere Bestimmungen wurden alle bei Zimmertemperatur vorgenommen (+ 18° C), eventuelle Temperaturdifferenzen lassen sich durch die Formel korrigieren:

$$\sigma_t = \sigma_0 (1 - \gamma t)\ \gamma = \pm\ 0{,}003.$$

σ_t Oberfl.-Sp. bei gesuchter Temperatur, σ_0 der bei herrschender Temperatur gefundene Wert.

Wie *Kisch*[3]) und *Brinkman*[4]) gezeigt haben, sind die Werte bei demselben Patienten bei verschiedenen Messungen immer gleich, nur weisen, wie oben schon erwähnt, die einzelnen Verfahren Differenzen untereinander auf, so sind nach *Tominaga*[5]) die mit der Ringmethode gefundenen Werte 10 Dyn/cm kleiner als die Stalagmometerwerte, was bei Vergleichen mit Ergebnissen anderer Untersucher zu berücksichtigen ist.

Es wurden auf unserer Inneren Abteilung in der Zeit vom Dezember 1924 bis Juni 1925 etwa 270 Oberfl.-Sp.-Bestimmungen ausgeführt; es wurde fast jeder Zugang untersucht. Aus Raummangel können die einzelnen Resultate nicht aufgeführt werden, es folgt deshalb eine Zusammenstellung der nach Krankheitsgruppen geordneten Fälle.

I. Sera von Kontrollfällen.

Es handelt sich um organisch Gesunde, Neuropathen, Männer mit leichten unspezifischen Hautaffektionen (Scabies), und unkomplizierte Gonorrhoen. Wir fanden als Durchschnittswert bei 45 Fällen **57,48 Dyn/cm**, was gut mit den bisher veröffentlichten Werten übereinstimmt. *Brinkman*[6]) gab bei Anwendung derselben Methode 55 bis 57 Dyn/cm als Norm an.

---

[1]) *T. Tominaga*, diese Zeitschr. **140**, 1923.
[2]) *Tagakoro, Tetsuturo*, Journ. of Biol. **3**, 1924.
[3]) *Bruno Kisch*, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 37.
[4]) *Brinkman*, Arch. néerl. de phys. de l'homme et des animaux 1922, Nr. 7.
[5]) a. a. O.
[6]) a. a. O.

II. Sera bei verschiedenen Erkrankungen.

1. *Nicht tuberkulöser Entzündungen.*

Bei 14 Fällen von Arthritiden, Endocarditis, Nephritis ergab sich ein Wert von **57,58 Dyn/cm**, d. h. gegen den Normalwert keine nennenswerte Abweichung.

2. *Gynäkologische Erkrankungen.*

(Adnextumoren, Kolpitis.) Es wurde hier als Mittelwert **56,72 Dyn/cm** gefunden; ein sicher unter der Norm liegender Wert. Interessant ist das Resultat der bei allen Fällen gleichzeitig angestellten Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen. Wir bedienten uns der *Linzenmeier*schen[1]) Methode: zu 0,2 ccm 5proz. Natr.-citric.-Lösung 0,8 ccm Blut durch Venenpunktion gewonnen. In allen Fällen bestand eine hohe Beschleunigung der Skg. (10 bis 34 Minuten, nur einmal 230 Minuten). Es entspricht also einer Erniedrigung der Oberfl.-Sp. eine Beschleunigung der Skg.; es ist dieses Verhalten im Hinblick auf die Resultate bei der Tuberkulose (s. unten) sehr eigentümlich. Da aber nur acht Fälle dieser Art untersucht werden konnten, läßt sich kein endgültiges Urteil über Zusammenhang von Senkungsbeschleunigung und Oberfl.-Sp. abgeben.

3. *Carcinome.*

Es wurden 14 Fälle *) untersucht, von denen bis auf ein Scheiden-Ca-Rezidiv alle unbehandelt waren. Es wurde für Carcinome ein Wert von **56,59 Dyn/cm** ermittelt, was einer Erniedrigung entspricht. Ähnliche Resultate gibt *Solowiew*[2]) an, der bei Extrakten aus Carcinomen, Sarkomen eine Erniedrigung der Oberfl.-Sp. feststellen konnte, die anscheinend mit dem Grad der Malignität parallel zu gehen scheint. Experimentell konnte *Kopaczewski*[3]) nachweisen, daß Implantation von Sarkomgewebe unter die Haut bei Ratten eine Erniedrigung der Oberfl.-Sp. von 5 Dyn/cm hervorruft; das gleiche fand er beim Teercarcinom. Erst kürzlich bestätigte *Bauer*[4]), daß beim Krebs die Oberfl.-Sp. erniedrigt wäre (ohne jedoch irgendwelche Werte anzugeben); der Autor führt auf diese Erniedrigung sogar eine neue Krebsgenese zurück. Zur Erhöhung der Oberfl.-Sp. und somit zur Verhinderung einer Krebsentwicklung stellte er aus der Milz ein Präparat dar, was im Tierversuch einen scheinbar günstigen Einfluß ausübte.

4. *Nicht tuberkulöse Lungenerkrankung.*

Nach Untersuchung einer größeren Anzahl von Patienten (40) ergab sich — es handelte sich um Bronchitiden, Grippen, Pleuritiden — als Mittelwert **57,37 Dyn/cm**, ein normaler Wert. Die Senkung schwankte zwischen 60 und 300 Minuten.

---

[1]) *Linzenmeier*, Zentralbl. f. Gyn. **30**, 1920; Münch. med. Wochenschr. **1923**, H. 40.

[2]) *B. M. Solowiew*, Zeitschr. f. Krebsforsch. **21**, 1924.

[3]) *Kopaczewski*, C. r. Hebd. de l'acad. des sciences **179**, 1924.

[4]) *E. Bauer*, Münch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 41.

*) Ein Teil der Sera stammt aus der Univ.-Frauenklinik, für deren Überlassung ich Herrn Prof. *Warnekros* auch an dieser Stelle meinen besten Dank abstatten möchte.

Die bei verschiedenen Fällen aus allen der eben aufgezählten Gruppen in größeren Abständen wiederholt vorgenommenen Messungen ergaben, daß die Konstanz der Oberfl.-Sp., die nach *Brinkman*[1]) eine Regulierung zur Voraussetzung haben müsse, zutrifft.

III. Sera von tuberkulösen Patienten.

Hinsichtlich der Konstanz der Oberfl.-Sp. wurden wir bei Nachprüfung an Lungentuberkulosen eines anderen belehrt. Es handelte sich um 27 Patienten mit insgesamt 149 Bestimmungen der Oberfl.-Sp.; die Fälle zeigten positiven Bazillenbefund sowie einen deutlichen klinischen und Röntgenbefund. Da sich bei den verschiedenen Untersuchungen derselben Patienten große Differenzen ergaben, muß von einem Mittelwert abgesehen und ausführlicher auf die einzelnen Fälle eingegangen werden.

Bei den weitaus meisten Fällen fand sich bei der ersten Bestimmung der Oberfl.-Sp. ein *erhöhter*, über der Norm liegender Wert (58 bis 60 Dyn/cm), und zwar war die Erhöhung der Oberfl.-Sp. bei Fällen mit ausgedehnten klinischen Befunden, besonders exsudativer Form, beträchtlicher als bei solchen mit geringem Befunde. Im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes (bei Ruhe, guter Kost, Roborantien) ergab sich nun, daß mit zunehmender Besserung eine Erniedrigung der Oberfl.-Sp. eintrat, d. h. die Werte näherten sich dem Normalen. Gleichzeitig verlangsamte sich die anfangs beschleunigte Senkungsgeschwindigkeit, so daß sich die Senkung verlangsamt, während die Oberfl.-Sp. sinkt. Es ergab sich bei verschiedenen Patienten, die eine weitgehende Besserung des klinischen und Röntgenbefundes aufwiesen, daß bei der Entlassung die Oberfl.-Sp. einen fast normalen Wert aufwies, während andere Patienten, die als verschlechtert das Krankenhaus verließen, noch erhöhte Werte der Oberfl.-Sp. zeigten (58,31 bis 59,44 Dyn/cm). Einige Fälle, die nach längerer Behandlung ad exitum kamen, zeigten sub finem eine starke, hoch über der Norm liegende Oberfl.-Sp. (60 bis 63 Dyn/cm); die Senkung hielt sich dann auch im Sinne einer Verschlechterung.

Die geschilderten Verhältnisse werden am deutlichsten an Hand einiger Beispiele:

Nr. 2. *Erika B.*, 26 Jahr. Prod. Tbc.

10. Februar 1925	61,64 Dyn/cm	Senkung 31 Minuten
17. März 1925	61,46 „	
25. April 1925	57,07 „	„ 80 „

Arbeitsfähig, wesentlich gebessert entlassen.

Nr. 17. *Franz K.*, 24 Jahr. Prod. Tbc.

13. Dezember 1924 . . .	57,64 Dyn/cm	Senkung 16 Minuten
20. Februar 1925	56,73 „	
4. April 1925	56,37 „	„ 37 „

Arbeitsfähig, gebessert entlassen.

Nr. 6. *Anna B.*, 24 Jahr. † Käsige Pneumonie, exsudative Form.

18. Dezember 1924 . . .	57,24 Dyn/cm
16. Januar 1925	56,70 „
2. Februar 1925	59,03 „

[1]) a. a. O.

Nr. 23. *Auguste Sch.*, 64 Jahr †. Cirrhot. Form, Darmtuberkulose.

Dezember 1924 . . .	56,70 Dyn/cm	
20. Februar 1925	64,41 ,,	

Nr. 15. *Margarete Ho.*, 27 Jahr. Cirrhot. Form.

31. Januar 1925	60,81 Dyn/cm	Senkung 30 Minuten
5. März 1925	60,85 ,,	
2. April 1925	60,04 ,,	
25. April 1925	57,55 ,,	,, 30 ,,

Patientin wurde gebessert mit Rückgang der klinischen und röntgenologischen Erscheinungen entlassen, die allerdings nur zweimal angestellte Senkung zeigte nicht die Zeichen der Besserung.

Und zum Schluß noch ein Fall mit wechselndem Verlauf; klinisch zeigte sich nach guter Besserung plötzlich wieder weitgehende Verschlimmerung.

Nr. 28. *Minna T.*, 47 Jahr. Exsudative Tbc.

7. Februar 1925	60,27 Dyn/cm	Senkung 20 Minuten
17. März 1925	60,79 ,,	,, 37 ,,
12. Mai 1925	55,59 ,,	,, 10 ,,
4. Juni 1925	57,66 ,,	,, 22 ,,
18. Juni 1925	58,31 ,,	

Ungeheilt, arbeitsunfähig entlassen.

Es ergibt sich also, daß je nach dem Grad der Schwere die Oberfl.-Sp. erhöht ist, die bei Besserung im klinischen Befund einer Erniedrigung Platz macht. Anderenfalls konnte bei der anfangs stark beschleunigten Senkung sehr häufig eine Verlangsamung festgestellt werden. Wie diese Zusammenhänge: Senkung und Oberflächenspannung, die sicher der Ausdruck einer gemeinsamen physikalisch-chemischen Ursache sind, zu deuten sind, kann ohne experimentelle Untersuchung nicht gesagt werden.

Diese besonders bei der Tuberkulose festgestellten Veränderungen der Oberfl.-Sp. haben uns veranlaßt, unsere noch nicht sehr zahlreichen Resultate zu veröffentlichen; Nachprüfungen an größerem Material (Heilstätten und Sanatorien) könnten Klarheit bringen, ob das Verhalten der Oberfl.-Sp. eventuell prognostisch zu verwerten wäre.

Zusammenfassung.

1. Die Ringmethode nach *R. Brinkman* hat sich als einfach, schnell auszuführen und für klinische Zwecke brauchbar bewährt.

2. Bei Gesunden, auch bei Kranken, ohne Veränderungen im Gesamtorganismus ist die Oberfl.-Sp. ein konstanter Wert.

3. Die von verschiedenen Autoren gefundene Erniedrigung der Oberfl.-Sp. bei Carcinomen konnte auch unsererseits bestätigt werden.

4. Bei der Tuberkulose ist die Oberfl.-Sp. je nach dem Grade der Erkrankung erhöht, um bei Besserung sich der Norm zu nähern, während sie bei Verschlechterung sich weiter erhöht.

5. Die Senkungsgeschwindigkeit verläuft in zahlreichen Fällen entgegengesetzt; einer Erniedrigung entspricht eine Verlangsamung und umgekehrt.

Acetaldehyd als Zwischenprodukt der Pflanzenatmung.

Von

G. Klein und K. Pirschle.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 30. November 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Atmung der Pflanzen verläuft grob schematisch nach der Formel: $C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 = 6\,CO_2 + 6\,H_2O$.

Diese Formulierung bedingt einen Atmungsquotienten ($CO_2 : O_2$) = 1, wie er auch in der Tat sehr häufig gefunden wurde; nicht nur bei Blütenpflanzen, sondern auch bei Kryptogamen, bei Meeresalgen [*Harder*[1]), *Kniep*[2])], ja selbst bei Pilzen und Bakterien [*Lindner*[3]), *Noack*[4])]. Ist der Quotient von 1 verschieden, so hat das seinen Grund darin, daß entweder das Atmungsmaterial ein anderes ist (Fette, Eiweiß, organische Säuren) oder daß die oxydative Zuckerspaltung nicht bis zu Ende geht und bei weniger oxydierten, daher noch oxydationsfähigen Verbindungen stehen bleibt[5]) [6]) [7]).

Jedenfalls aber tritt CO_2 und H_2O bei dem als aerobe Atmung (oder Atmung schlechthin) bezeichneten oxydativen abbauenden Stoffwechselvorgang der Pflanzen auf. Der qualitative Nachweis der Atmungskohlensäure ist so einfach, daß er als Vorlesungsexperiment vorgeführt werden kann, die quantitative Bestimmung stößt gleichfalls auf keine Schwierigkeiten, sofern man nur eine entsprechend subtil gebaute Apparatur [*Pettenkofer*, *Palladin*, *Kostytschew*, *Polowczow-Richter*, *Bonnier-Mangin*, *Godlewski* usw.[7])] verwendet, weniger bequem und auch weniger wichtig ist die Bestimmung des Wassers, doch ist die diesbezügliche Vermutung *Saussures*[8]) von *Liaskowsky*[9]) qualitativ und quantitativ befriedigend bestätigt worden.

So zahlreich also bewiesen wurde, daß bei der Atmung CO_2 und H_2O gebildet wird, so sicher ist es, daß diese Produkte nicht unmittelbar

---

[1]) *Harder*, Jahrb. f. wiss. Bot. **56**, 254, 1925.
[2]) *Kniep*, Int. Rev. f. Hydrobiol. **1**, 38.
[3]) *Lindner*, Jahrb. f wiss. Bot. **55**, 1, 1915.
[4]) *K. Noack*, ebendaselbst **59**, 413, 1920.
[5]) *Benecke-Jost*, Pflanzenphysiologie, II. Aufl., **1**, Jena 1924.
[6]) *Czapek*, Biochem. d. Pflanze, II. Aufl., **3**, Jena 1921.
[7]) *Kostytschew*, Pflanzenatmung. Berlin 1924.
[8]) *Saussure*, Chemische Untersuchungen über Vegetation (Ostwalds Klassiker **15** und **16**).
[9]) *Liaskowsky*, Versuchsstation **17**, 219, 1847.

aus dem Zuckermolekül durch oxydative Spaltung entstehen können. In diesem Sinne ist auch obige Formulierung immer nur als summarische Bruttoformel, niemals aber als Reaktionsgleichung gewertet worden. Ein direkter Zerfall des Zuckermoleküls, ein so großes Gefälle der potentiellen Energie (674000 cal) ist undenkbar, es müssen demnach Zwischenstufen durchlaufen werden. Die Frage nach diesen Zwischenprodukten blieb bisher offen.

Für einen speziellen Fall der Pflanzenatmung, bei der alkoholischen Gärung der Hefe, ist von *Neuberg* und Mitarbeitern[1]) Acetaldehyd als intermediäres Zwischenprodukt einwandfrei nachgewiesen, Brenztraubensäure wahrscheinlich gemacht worden[2]). Es liegt in der Natur der Sache, daß Zwischenprodukte ungleich schwerer nachzuweisen sind als Endprodukte. Endprodukte lassen sich durch Experimentieren in großem Stile, durch Massenkulturen beliebig anreichern. Nicht so Zwischenprodukte. Bei der Sehnelligkeit, mit der die einzelnen Zwischenstufen durchlaufen werden, ist anzunehmen, daß die intermediär gebildeten Produkte momentan, in statu nascendi, weiter verarbeitet werden. Nur durch Zusatz besonderer Agenzien, die rasch reagieren und nicht wieder gespalten werden, ist es möglich, derartige labile Formen „abzufangen", d. h. sie im Moment ihres Entstehens wenigstens teilweise aus dem Stoffwechselgetriebe herauszugreifen, festzulegen und damit einer analytischen Bestimmung zuzuführen. Es ist das besondere Verdienst *Neubergs*, diese Abfangmethode geschaffen, in vollem Umfang gewürdigt und angewendet zu haben. Nachdem *Kostytschew*[3]) unter dem Einfluß von Zink- und Cadmiumsalzen zuerst eine Anhäufung von Acetaldehyd in gärenden Zuckerlösungen beobachtet hatte *), gelang es *Neuberg* und Mitarbeitern, in zahlreichen Arbeiten die intermediäre Bildung des Acetaldehyds bei der Hefegärung sicherzustellen und nach verschiedenen Richtungen genau zu studieren. Es erübrigt sich, näher darauf einzugehen [vgl. *Neuberg*[1])], auf Details wird im speziellen Teile Bezug genommen werden. Außer bei Hefe konnte *Neuberg* mit seinem Verfahren auch bei anderen Mikroorganismen (Bakterien und Pilzen) Acetaldehyd sicherstellen, und, in Übertragung seiner Methode auf die tierische Physiologie, ihn *Hirsch*[4]) sogar in der Muskulatur von Kalt- und Warmblütern nachweisen.

---

[1]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, Ergebn. d. Physiol., I. Abt., **21**, 400. München 1923.

[2]) *M. v. Grab*, diese Zeitschr. **123**, 69, 1921.

[3]) *S. Kostytschew* und *E. Hübenet*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 359, 1912.

[4]) *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **117**, 113, 1921; **134**, 415, 1922.

*) Der Befund und seine Deutung sind allerdings nicht beweiskräftig. Siehe *v. May*, diese Zeitschr. **141**, 447, 1923; *Neuberg* in Oppenheimers Handb. d. Biochem. **2**, 449, 1924.

Da die Keimung der Samen in ihrem ersten Stadium der alkoholischen Gärung parallel läuft[1]) und da außerdem *Kostytschew*[2]) in atmenden Pappelblüten Acetaldehyd nachweisen konnte, war der Gedanke naheliegend, daß Acetaldehyd ganz allgemein als Zwischenprodukt der Pflanzenatmung auftritt und der Verlauf eines so grundlegenden Prozesses wie die Atmung im Pflanzenorganismus dem Vorgang im tierischen prinzipiell ähnlich ist. Dazu war es vor allem notwendig, Objekte unter aeroben Bedingungen zu studieren, da die anaerobe Atmung mit der alkoholischen Gärung so gut wie identisch ist und ein Nachweis von Acetaldehyd nichts wesentlich Neues aufgezeigt hätte. Wir betonen bei dieser Gelegenheit, daß auf Grund der neueren Ergebnisse ein prinzipieller Unterschied zwischen Gärung, Sauerstoffatmung und anaerober (intramolekularer) Atmung nicht gemacht werden kann und auch nicht besteht; das Atmungs-(Gär-)material (meist Zucker) durchläuft einige Stufen, die in weiterem Verlauf, je nachdem ob Sauerstoff vorhanden ist oder nicht, weiter oxydiert werden oder untereinander reagieren. Gelänge es, das ständige Auftreten von Acetaldehyd nachzuweisen, so wäre ein weiterer Beweis für die (chemische) Identität dieser drei Prozesse erbracht und für den Streit des Zusammenhangs oder Nichtzusammenhangs ein wichtiges Argument geliefert. Es ließe sich dann der Prozeß [in Erweiterung von *Kostytschew*[3])] unter dem Gesamttitel „Pflanzenatmung" schematisch etwa so darstellen: Zur Hexose führen verschiedene Wege, entweder sie ist als solche schon vorhanden (Glucose, Fructose) oder es werden höhere Kohlenhydrate durch hydrolysierende Enzyme dazu abgebaut (Stärke, Glykogen, Inulin, Saccharose, Maltose usw.), sie kann aus Glucosiden gespalten werden, nicht von der Hand zu weisen ist schließlich der Gedanke, daß auch die Veratmung von Nichtzuckern (Fette, organische Säuren, Alkohole usw.) über Zucker geht, so daß die Hexose als erstes Atmungszwischenprodukt anzusprechen wäre. Zwischen Zucker und Acetaldehyd

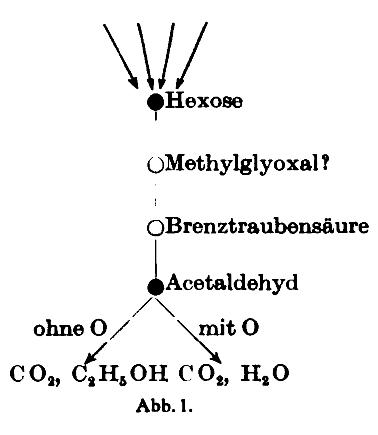


Abb. 1.

[1]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 165, 1924. *E. Godlewski* und *Polzeniusz*, Anz. d. Akad. d. Wiss. 1897, S. 267; 1901, S. 227.

[2]) *Kostytschew, Hübenet* und *Scheloumoff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **88**, 105, 1913.

[3]) *Kostytschew*, Pflanzenatmung. Berlin 1924.

liegen einige Stufen, von denen die Brenztraubensäure experimentell wahrscheinlich gemacht ist, für Methylglyoxal nach *Neuberg*[1] [2]) manches spricht, während Dioxyaceton und Glycerinaldehyd [nach *Lebedew* [3])] sehr hypothetischer Natur sind. Vom Acetaldehyd gehen die Wege wieder auseinander; vollständige Oxydation führt zu CO_2 und H_2O (aerobe Atmung), Mangel an Sauerstoff zu Alkohol. Außerdem können selbstverständlich noch andere Möglichkeiten eintreten: unvollständige Oxydation unter Bildung von organischen Säuren [Sukkulenten [4]) [5]) [6])], Aldolkondensation [unter Bildung von Buttersäure, vierte Vergärungsform [7])], Oxydation des Alkohols zu Essigsäure [Essiggärung [8])], Fälle, wie sie nicht nur bei Mikroorganismen, sondern auch bei höheren Pflanzen, unter besonderen Umständen oder regelmäßig, auftreten. Es sind im Schema nur die beiden wichtigsten Prozesse eingetragen, im übrigen soll ja das Schema nicht allen Einzelheiten gerecht werden, sondern nur mit ein paar Strichen den wichtigsten Zusammenhang zwischen aerober Atmung, anaerober Atmung und Gärung ausdrücken.

Die wesentlichsten Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden bereits im Juni 1924 (physik.-chem. Ges. in Wien) und beim Kongreß der Naturforscher und Ärzte in Innsbruck vorgetragen [9]). Seither erschienen zwei Mitteilungen von *Neuberg* und *Gottschalk* [10]) über Acetaldehydbildung bei der anaeroben Atmung von Leguminosenkeimlingen, deren Ergebnisse sich, wie zu erwarten war, mit denen der Gärung decken und die in Übereinstimmung mit unseren Resultaten bei der aeroben Atmung den einheitlichen Verlauf der verschiedenen Atmungsformen, basierend auf der zentralen Stellung des Acetaldehyds, erweisen.

Methodisches.

Als Versuchsobjekte kamen vor allem Organe in Betracht, die stark atmen, also Blüten und Keimlinge, vergleichsweise auch vegetative

---

[1]) *C. Neuberg* und *J. Kerb*, diese Zeitschr. **58**, 406, 1913; 58, 158, 1913.

[2]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, Ergebn. d. Physiol. , I. Abt., **21**, 400. München 1923.

[3]) *Lebedew*, C. r. **153**, 136, 1911; Ber. d. chem. Ges. **45**, 3240, 1912.

[4]) *Benecke-Jost*, Pflanzenphysiologie, II. Aufl., **1**. Jena 1924.

[5]) *Czapek*, Biochem. d. Pflanze, II. Aufl., **3**. Jena 1921.

[6]) *Kostytschew*, Pflanzenatmung. Berlin 1924.

[7]) *C. Neuberg* und *B. Arinstein*, diese Zeitschr. **117**, 269, 1921.

[8]) *C. Neuberg* und *F. F. Nord*, diese Zeitschr. **96**, 158, 1919; *C. Neuberg* und *E. Wolff*, ebendaselbst **106**, 281, 1920 ; *W. H. Peterson* und *E. B. Fred*, Journ of biol. Chem. **44**, 29, 1920.

[9]) *G. Klein*, Naturwissenschaften **1925**, 13. Jahrg , Heft 2, S 21.

[10]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr **151**, 167, 1924; **160**, 256, 1925.

Organe (Blätter), daneben zur Parallele Autolysate. Trotzdem war durch einfache theoretische Erwägung von vornherein sicher, daß hier nur minimale Mengen von Acetaldehyd würden gewonnen werden, nicht zu vergleichen mit den enormen Mengen, die im Stoffwechsel von Einzellern (Hefe, Bakterien) umgesetzt werden. Die enzymatische Ausrüstung ebenso wie die spezifische Leistungskapazität dieser niederen Organismen ist eben eine ungleich wirksamere als die der höheren Pflanzenzelle. Vergleicht man die Atmungsintensitäten von Bac. mesentericus vulgatus: 1164,3 ccm O_2/24 Stunden oder Aspergillus niger: 1751 bis 1874 ccm CO_2/24 Stunden mit den (relativ großen!) von Weizenwurzeln: 67,9 ccm O_2/24 Stunden oder Blattknospen von Syringa vulgaris: 35 ccm CO_2/24 Stunden oder keimenden Samen von Sinapis nigra: 58 ccm CO_2/24 Stunden (*Kostytschew*, Pflanzenatmung, S. 5), so ergibt sich daraus wohl klar, daß in den Intensitäten der Stoffumsetzung ein krasser Unterschied zwischen höheren Pflanzen und vergärenden Mikroorganismen besteht. Dazu kommt noch, daß die als Abfangmittel verwendeten Reagenzien, sowohl die Sulfite (K_2SO_3, $KHSO_3$, Na_2SO_3, $NaHSO_3$, $CaSO_3$) infolge ihres SO_2-Gehalts, als insbesonders das auf Grund seiner Lipoidlöslichkeit giftige Dimedon [Dimethyl-hydro-resorcin[1])] die Pflanzen schädigen und daher langdauernde Versuche bzw. eine Konzentration des Abfangmittels, die halbwegs quantitativ wirken würde, unmöglich machen. Solches ist bei Hefe tunlich, wo man durch öfteres Eintragen frischer Portionen ständig gut gärkräftiges Material hat, nicht aber im Gewebe höherer Pflanzen.

Die Voraussetzungen schienen also nicht sehr günstig. Es war damit zu rechnen, minimale Mengen (Milligramm oder vielleicht Bruchteile davon) an Acetaldehyd isolieren und identifizieren zu müssen, wollte man nicht mit Kilogrammen von Material arbeiten, was uns technisch und materiell unmöglich war. Mit ähnlichen Schwierigkeiten hatte übrigens auch *Neuberg* bei seinen Untersuchungen über die Atmung der Warmblütermuskulatur zu kämpfen, wie die aus großen Quanten verarbeiteten Materials (100 g) erhaltenen *relativ* geringen[2]) Mengen Aldehyd (8 mg) zeigen.

Als Abfangmittel wurde einerseits Dimedon, andererseits Natriumsulfit (Na_2SO_3) verwendet. Das Dimedon in Leitungswasser 1 : 1000, bei Pflanzengereibseln oder kurzdauernden Versuchen konnten auch stärkere Konzentrationen 1 : 500, 1 : 400 angewendet werden. Zu

---

[1]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. 89, 365, 1918; 106, 281, 1920.

[2]) Die tatsächliche Ausbeute beträgt fast 45 Proz. (*C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. 158, 255, 1925).

beachten ist unter Umständen die saure Reaktion des Dimedons, wodurch Leitungswasser mit einem normalen p_H von 8,0 bis 8,1 auf 4,3 bis 4,5 sinkt. Eine Pufferung schien aber überflüssig, da in unseren Versuchen mit höheren Pflanzen (im Gegensatz zu Hefe) eine saure Reaktion der Flüssigkeit den natürlichen Bedingungen angemessen ist. Natriumsulfit, 1 Proz. in Leitungswasser, erwies sich gleichfalls als sehr günstig, dagegen konnte das schwer lösliche Calciumsulfit, das sich bei Hefeversuchen ausgezeichnet bewährte, für Aufsaugversuche keine Verwendung finden, wohl aber für Macerate.

Für Versuche mit Maceraten wurden die Pflanzenkeimlinge oder keimende Samen grob zerrieben und in einer entsprechenden Menge Dimedon bzw. Na_2SO_3-Lösung aufgeschwemmt, auf 10 g lufttrockene Samen etwa 200 ccm Wasser. Die Gefäße kamen in den Thermostaten bei 27 bis 30°. Vom Zusatz eines Antiseptikums wurde Abstand genommen, da sich weder Toluol noch Rivanol bewährten und nur mit kurzdauernden Versuchen gearbeitet wurde. Wir müssen *Kostytschew*[1]) beipflichten: „... von einer ‚aseptischen' Versuchsanordnung wurde Abstand genommen (die bei Anwendung beträchtlicher Mengen des betreffenden Materials nichts anderes als Selbsttäuschung ist), die Mitwirkung niederer Organismen kann jedoch als ausgeschlossen betrachtet werden, da sämtliche Versuche von kurzer Dauer waren und mit vollkommen frischen Objekten ausgeführt wurden." Langdauernde Versuche (mehrere Tage) gaben kein klareres Bild als kurzfristige, eine Versuchsdauer von 5 bis 7 Stunden genügt vollständig. Wähernd dieser Zeit ist bei sauberem Arbeiten (Samen gut waschen, nur kräftige, nicht infizierte Keimlinge nehmen usw.) eine nennenswerte Infektion nicht zu befürchten. Tritt eine solche doch ein, wovon man sich jederzeit durch mikroskopische Kontrolle überzeugen kann, so wurde das Gefäß verworfen. Ähnlich wurden auch Blütengereibsel, Preßsäfte und dergleichen behandelt.

Eine derartige Anordnung gestattet allerdings nur ein Arbeiten unter anaeroben Bedingungen, selbst ständige, kräftige Durchlüftung der Gefäße wird niemals vollständige Aeration herbeiführen können[2]). Ein Auflegen der Keimlinge auf Filtrierpapier war für unsere Zwecke untunlich, es blieb also nur übrig, die Pflanzen als ganze aufsaugen zu lassen. Blüten wurden mit dem Blütenstiel, Keimlinge knapp über dem Samen abgeschnitten und in passende Gefäße (Glasschalen, Chiningläser usw.) in Dimedon- bzw. Sulfitlösung gestellt; im Winter ins Warmhaus, im Sommer an ein sonniges Fenster (Blätter, Keimlinge selbstverständlich zur Ausschaltung der Assimilation unter Sturz).

---

[1]) *Kostytschew*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **31**, 125, 1913.
[2]) *Kostytschew* und *Scheloumoff*, ebendaselbst **31**, 422, 1913.

Es bewährte sich nicht, derartig frisches Material in den Thermostaten zu bringen, die Pflanzen wurden nach kurzer Zeit welk, braun und starben ab. Dadurch war ein ganz natürlicher, aerober Verlauf der Atmung gewährleistet, die Abfangung aber sehr erschwert; denn das Abfangmittel konnte sich nur insoweit auswirken, als es mit dem Wasser aufgesogen wird und sich im Gewebe verteilt. Die besten Resultate wurden mit stark transpirierenden Objekten erzielt (Blüten, Keimlinge), auch mußte die Versuchszeit länger genommen werden (einige Tage). Die Pflanzen wurden erst verarbeitet, wenn sie welk zu werden begannen.

Zur Isolierung des gebildeten Aldehyd-Kondensationsprodukts bedienten wir uns zunächst des Verfahrens, welches *Klein* und *Werner*[1]) für ihre Assimilationsversuche ausgearbeitet hatten. Das Versuchsmaterial wurde mit Quarzsand fein zerrieben, zweimal mit heißem Alkohol extrahiert und klar filtriert. Das Filtrat muß nun vom Alkohol vollständig befreit werden, da restlicher Alkohol beim folgenden Ausschütteln mit Petroläther die Verteilung des Acetaldehyds stört. Das Abdampfen des Alkohols erfolgte im Vakuum unter 40^0. Beim Extrahieren der Pflanzen nimmt der Alkohol genug Wasser auf, so daß ein besonderer Wasserzusatz überflüssig ist. Das auf diese Weise vom Alkohol befreite Filtrat wurde stark angesäuert und mit dem gleichen Quantum Petroläther, Siedepunkt 40^0 (besser als Äther oder Chloroform), eine Viertelstunde kräftig geschüttelt, bis zur klaren Entmischung stehengelassen und die wässerige Schicht aus dem Schütteltrichter abgelassen. Das gesamte Acetaldomedon geht dabei in den Petroläther über. Dieser wurde nach Zusatz einiger Tropfen alkalischen Wassers, wie vorher der Alkohol, im Vakuum bei 40^0 vollständig abgedampft, so daß schließlich das ganze Flüssigkeitsvolumen auf diese paar Tropfen, etwa 1 ccm, reduziert war. Diese wurden neutralisiert, in einer selbstgeblasenen Mikroretorte unter Kühlung destilliert, das Destillat direkt in konzentrierter wässeriger Dimedonlösung aufgefangen. Während Formaldomedon fast momentan auskristallisiert und man schon während des Destillierens die Bildung der weißen Nadeln beobachten kann, dauert es bei Acetaldehyd etwas länger. Ein Zusatz von NaCl (fest) fördert die Ausfällung des Produkts. Unmittelbar nach dem Destillieren ist das Röhrchen meist ganz klar, erst nach 12 bis 24 Stunden scheiden sich die Kristalle ab. Sie erscheinen im Mikroskop in Form von farblosen, kurzen, gedrungenen Nadelbüscheln, Spießen, gewöhnlich breiten, rhombischen Blättchen zu Büscheln vereinigt, im Gegensatz zu den langen feinen Nadeln des Formaldomedons. Durch Abzentrifugieren und Waschen konnte das Produkt isoliert und mit

---

[1]) *G. Klein* und *O. Werner*, **168**, 361, 1926.

dem Mikroschmelzpunktsapparat von *Klein*[1]) als Acet-aldomedon vom Schmelzpunkt 138 bis 140° identifiziert werden.

Das ist in großen Zügen die Methodik, wie sie von *Klein* und *Werner*[2]) für ihre Studien bei der Kohlensäureassimilation verwendet wurde, da sich ein direktes Überdestillieren des Aldehyds als nicht durchführbar erwies. Sie besteht im wesentlichen darin, durch Extrahieren, Abdampfen und Ausschütteln das Aldehyd-Kondensationsprodukt auf kleinsten Raum einzuengen und dadurch nachweisen zu können. Es muß bemerkt werden, daß für unsere Zwecke manches modifiziert, dem vorliegenden Pflanzenmaterial angepaßt werden mußte, das sich durchaus nicht immer nach dem gleichen Schema behandeln ließ. Selbstverständlich werden sich Samen mit ihrem reichen Gehalt an Reservestoffen anders verhalten als Blüten oder Blätter.

Stärkehaltige Samen verarbeiten sich relativ gut (Gramineen usw.), da die Stärke bzw. der beim hydrolytischen Abbau daraus entstehende Zucker nicht stört. Dagegen bereiten eiweißreiche Samen (Leguminosen) große Schwierigkeiten. Die eingeengten Extrakte schäumen beim Ausschütteln mit Petroläther so stark, daß eine klare Entmischung kaum eintritt. Es wurde versucht, durch Fällung mit Bariumchlorid, Kupfersulfat, Sublimat, Tannin usw. das Eiweiß zu entfernen; was auch gelingt, man erhält klare Filtrate. Nur war die Befürchtung, durch den voluminösen, kolloidalen Niederschlag würde auch Acetaldomedon mitgerissen, nur zu gerechtfertigt, wie entsprechende Versuche zeigten. Es mußte also davon Abstand genommen werden. Dagegen erwies sich als sehr vorteilhaft, den schäumenden Petroläther mit konzentrierter Kochsalzlösung auszuschütteln. In den meisten Fällen trat klare Entmischung ein, schlimmstenfalls ging sie weit genug, daß mit geringen Verlusten klarer Petroläther abgehebert und weiter verarbeitet werden konnte. Geringer sind die Schwierigkeiten bei Objekten, die wenig oder keine Reservestoffe enthalten, also Blätter, Keimlinge usw., am besten lassen sich Blüten mit ihrem zarten, wasserreichen Gewebe verarbeiten. Am Prinzipiellen der Methode wurde nichts geändert, im einzelnen aber mußte — nach entsprechenden Vorversuchen — manche kleine Änderung angebracht, eventuell eine Eiweißfällung oder gelinde Fetthydrolyse eingeschaltet werden, um zum Ziele zu gelangen.

So befriedigend die Resultate waren, die mit vorstehend beschriebener Methode erhalten wurden, so schien die Ausarbeitung eines anderen Verfahrens doch aus zwei Gründen wünschenswert: Erstens sind die verschiedenen Manipulationen (zweimaliges Einengen, Aus-

---

[1]) *G. Klein*, Naturwissenschaften 1925, 13. Jahrg., Heft 2, S. 21.

[2]) *G. Klein* und *O. Werner* 168, 361, 1926.

schütteln usw.) ziemlich zeitraubend, bei größeren Versuchsserien fallen auch die beträchtlichen Mengen Petroläther, mit dem nicht gespart werden kann, ins Gewicht usw.; zweitens aber, was das Wichtigere ist, ist die Menge des erhaltenen Kristallprodukts so gering (3 bis 12 mg), daß sie — bei unseren Ausgangsmengen — nicht einer Wägung zugeführt werden kann, sondern nur eine Schätzung auf Grund von Vergleichsproben, die durch Destillation gewogener Acetaldomedonmengen erhalten worden waren, erlaubt. Diese muß immer subjektiv bleiben, sie durch einen objektiven, zahlenmäßigen Wert zu ersetzen, war um so notwendiger, als wir im weiteren Verlauf den Einfluß verschiedener Stoffe auf die Atmung studieren wollen. Es wurde darum versucht, eine womöglich einfacher zu handhabende und dabei quantitative Methode zur Acetaldehydbestimmung in atmenden Pflanzen zu finden.

Zugrunde gelegt wurde die Methode der Milchsäurebestimmung, wie sie von *Fürth* und *Charnass*[1]) gefunden und von *Embden-Neubauer*[2]), *Meyerhof*[3]), *Hirsch-Kauffmann*[4]) weiter ausgebildet wurde. Die Oxydation mit Permanganat in schwefelsaurer Lösung fiel bei uns weg, dagegen mußte besonderer Wert auf eine vollständige Spaltung des Aldehydkoppelungsproduktes bei der Destillation gelegt werden. Sehr ermutigend waren in dieser Hinsicht die Arbeiten von *Neuberg* und *Reinfurth*, die — was wir bestätigen können — einen Zusatz von Natriumcarbonat oder Lauge als ganz unzulänglich verwerfen, dagegen — worauf wir auf der Suche nach einem entsprechenden alkalischen Medium auch gekommen waren — Calcium- oder Magnesiumcarbonat empfohlen haben.

Die Bedenken *Treadwells*[5]) gegen die Sulfittitration mit Jod erscheinen uns, im Rahmen unserer Bedingungen, nicht stichhaltig. Auf die Bereitung der Sulfitlösung ist große Sorgfalt zu verwenden [vgl. Note [3])], da Kohlensäure (Luft) oder kohlensäurehaltiges Wasser den Titer rasch verdirbt. Doch konnte in blinden Versuchen mit destilliertem Wasser, mit Leitungswasser oder mit Kreideaufschwemmung keine nennenswerte Änderung beobachtet werden, so daß man den Sulfittiter während der Destillation und sofort folgenden Titration als konstant betrachten kann. Besonderer Wert ist auf gute Kühlung zu legen. Eiskühlung der Vorlage ergab keine wesentlich besseren Werte, es genügt, die Sulfitvorlage in fließendem Leitungswasser (8°C) zu halten. Dagegen erwies sich die Verwendung eines gewöhnlichen Kühlers mit Kugelrohr als unzulänglich. Erst durch Anwendung eines Rapidkühlers

---

[1]) *Fürth* und *Charnass*, diese Zeitschr. **96**, 199, 1910.
[2]) Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. V, 2, 1256, 1921.
[3]) *Meyerhof*, Pflügers Arch. **188**, 114, 1921.
[4]) *Hirsch-Kaufmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **140**, 25, 1924.
[5]) *Treadwell*, Lehrb. d. analyt. Chem., II. Quant. Analyse 1919, S. 595.

(mit eingezogenen vier dünnen Glasröhren, die allseitig von Wasser umspült werden) wurden die anfänglichen beträchtlichen Verluste vermieden. Vielleicht tut ein Metallkühler mit Schlangenrohr, wie ihn *Neuberg* verwendet, dieselben Dienste, uns stand ein solcher nicht zur Verfügung. Kontrollversuche mit gewogenen Aldomedonmengen ergaben nach dieser Methode einen konstanten Fehler von 13 bis 18 Proz.

Wir verfahren also folgendermaßen: Das Versuchsmaterial wird nach Abbruch des Versuchs mit Quarzsand fein zerrieben und extrahiert. Zur Extraktion verwenden wir nicht Alkohol, da das Abdampfen dieses (im Vakuum bei 40°) lange dauert, Reste von Alkohol oft zäh zurückgehalten werden und zu befürchten ist, daß bei stärkerem Erwärmen auch Acetaldomedon unter Verlust gespalten wird. Der Alkohol muß aber quantitativ entfernt werden, da auch geringe zurückbleibende Reste die nachfolgende Jodtitration stören würden. An Stelle von Alkohol verwenden wir daher 5 proz. Sodalösung, in der sich Acetaldomedon quantitativ löst. Das fein zerriebene Pflanzenmaterial wird also in nicht zu wenig (200 bis 300 ccm) 5 proz. warmer Sodalösung aufgeschwemmt, gut durchgeschüttelt und über Nacht stehengelassen. Dann wird die Flüssigkeit abgegossen bzw. durch Glaswolle filtriert und einige Male mit Wasser nachgewaschen. Ein klares Filtrieren durch Filtrierpapier geht nur langsam vor sich und ist überflüssig; es genügt, wenn alle gröberen Teilchen zurückbleiben. Das Filtrat samt Waschwasser (400 bis 500 ccm) kommt in einen 1-Liter-Rundkolben und wird mit 4 bis 5 g festem, gepulvertem Calciumcarbonat versetzt. Ein besonderer Zusatz von Talk oder dergleichen ist dadurch überflüssig, das Kreidepulver erfüllt diesen Zweck vollständig.

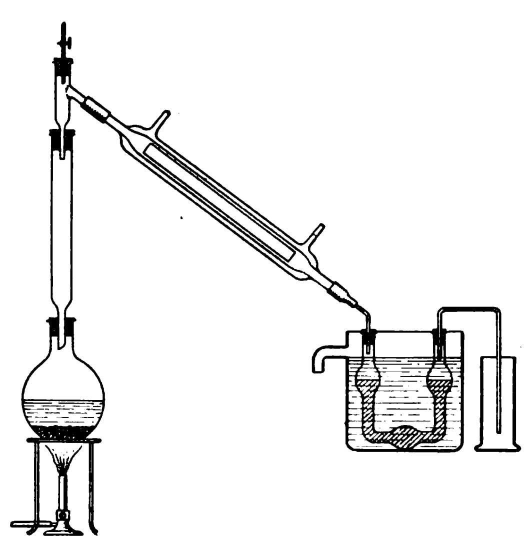


Abb. 2.

Die Anlage der Destillation ist aus beistehender Abb. 2 ersichtlich. Auf den Kolben kommt ein *Stutzer*sches Aufsatzrohr, welches, da die Steighöhe der Dämpfe vergrößert wird, verhindert, daß zuviel Wasser

übergeht. Auf das *Stutzer*sche Aufsatzrohr ist ein Stück Glasrohr mit Hahn aufgesetzt. Während der Destillation ist natürlich der Hahn geschlossen, erst am Schluß wird zuerst die Flamme entfernt, dadurch steigt die vorgelegte Flüssigkeit in den Kühler, dann der Hahn geöffnet, wodurch alles wieder in die Vorlage gedrängt wird. Durch diese einfache Manipulation wird der untere Teil des Kühlers und das Verbindungsstück zwischen Kühler und Vorlage, wo sich leicht Flüssigkeitströpfchen festsetzen, sauber ausgespült. Als Vorlage dient eine *Peligot*sche Röhre von etwa 80 ccm Gesamtvolumen. 50 ccm Sulfit (n/100 $NaHSO_3$) erwiesen sich in den meisten Versuchen als ausreichend, die beiden seitlichen Kugeln sind dann gerade bis zur Hälfte gefüllt. Die Anwendung einer Peligotröhre ist sehr zweckmäßig, da Gase bequem durchgehen, ohne daß man bei Druckdifferenzen ein Zurücksaugen der Flüssigkeit zu befürchten braucht. Auch im Kühler noch sich kondensierender Acetaldehyd wird auf diese Weise vom Sulfit sicher absorbiert. Die Peligotröhre befindet sich in einer Glaswanne mit seitlichem Abfluß, die von einem kräftigen Strom kalten Wassers (Leitungswasser) ganz durchspült wird. Der eine Schenkel der Peligotröhre ist mit einem zweimal rechtwinklig gebogenen Glasrohr versehen, welches bis zum Boden eines Glaszylinders reicht. Während der Destillation geht auch Wasser mit über, wodurch sich das Flüssigkeitsvolumen in der Vorlage vergrößert, so daß leicht ein Teil der vorgelegten Flüssigkeit hinausgedrängt wird, die auf diese Weise nicht verloren geht.

Destilliert wird bei nicht zu starker Flamme, langsam angewärmt, vom Kochen (erstem Aufwallen) an genau eine halbe Stunde. Es ist notwendig, die Zeit genau einzuhalten: bei kürzerer Destillationsdauer treten Verluste an Aldehyd ein, destilliert man länger, so können die durch Zersetzung übergehenden anderweitigen Produkte Vergleichsresultate verhindern.

Vorgelegt werden 50 ccm reiner etwa n/100 $NaHSO_3$-Lösung. Nur in einigen Fällen war es nötig, mehr vorzulegen. Während der Destillation wird der Titer der Sulfitlösung nicht verändert, wie Versuche mit destilliertem Wasser, Leitungs- (CO_2-haltigem) Wasser und Kreideaufschwemmung zeigten. Auch sonst blieb das Bisulfit, wenn es sorgfältig hergestellt und gut verschlossen aufbewahrt wird, ziemlich konstant, doch empfiehlt es sich, den Titer öfters, wenigstens vor jeder Versuchsserie, zu kontrollieren. Titriert wird mit n/100 Jodlösung, mit Stärke als Indikator, bis zur Blaufärbung.

Die Methode wurde mit reinem hergestellten Acetaldomedon (Schmelzpunkt 139°) auf ihre Brauchbarkeit geprüft: 5 bis 10 mg eingewogenes Acetaldomedon, also Mengen, mit denen in unseren Versuchen zu rechnen war, wurden in der angegebenen Weise destilliert

und mit einem Verlust von durchschnittlich 13 bis 18 Proz. zurückgewonnen. Die Methode kann also nicht als exakt quantitativ bezeichnet werden, genügt aber für unsere Zwecke vollkommen, da es uns in erster Linie darauf ankam, ziffernmäßig bestimmte Vergleichswerte zu bekommen, woran ein konstanter Fehler nichts ändert. Wir sind uns auch wohl bewußt, daß beim Destillieren des mit Soda extrahierten Pflanzenmaterials auch andere Substanzen mit übergehen, die mit Bisulift reagieren bzw. Jod binden. Auch das ändert nichts an der Brauchbarkeit unserer Anordnung, es ist nur nötig, je einen Kontrollversuch in Wasser (ohne Abfangmittel) in gleicher Weise zu behandeln und den dabei gefundenen Jodwert zu subtrahieren. Jedenfalls aber möchten wir unserer vereinfachten Methode gegenüber der *Neuberg*schen, die allein zur Reinigung des Aldehyds eine dreimalige Destillation (über Calciumcarbonat, Bleicarbonat und Schwefelsäure) nötig hat, schon aus zeitökonomischen Gründen entschieden den Vorzug geben. Überall, wo Acetaldehyd nachgewiesen werden konnte, ergaben die entsprechenden Destillationen einen merklich geringeren Jodverbrauch, d. h. eine Abnahme von freiem Bisulfit durch Bindung an den Aldehyd. Wir gehen wohl nicht fehl, wenn wir diese Differenz auf Kosten von Acetaldehyd setzen und entsprechend umrechnen. Der Umrechnung wurden die Reaktionsgleichungen zugrunde gelegt:

a) $CH_3{-}CHO + NaHSO_3 = CH_3{-}CH{<}^{OH}_{O-SO_2Na}$ (Aldehydbindung),

b) $SO_2 + H_2O + 2\,J = 2\,HJ + SO_3$ (Jodtitration).

1 J entspricht also $\frac{1}{2}$ Bisulfit bzw. $\frac{1}{2}$ Acetaldehyd, oder 1 ccm n/100 J ist gleich $\frac{1}{2}$ ccm n/100 CH_3CHO ist gleich 0,22 mg Acetaldehyd. Überdies wurde in jeder Versuchsserie eine Schmelzpunktbestimmung nach der erstbeschriebenen Methode durchgeführt.

Die vorstehend beschriebene Methode erlaubt auch anschließend eine qualitative Prüfung auf Acetaldehyd. Nach beendeter Titration wird die durch die Jod-Stärkereaktion blaue Sulfitlösung mit einem Tropfen Sulfit oder Natriumthiosulfat entfärbt und mit Diäthyl-Nitroprussidnatrium oder besser mit Piperidin-Nitroprussidnatrium[1]) auf Acetaldehyd geprüft. Es genügt, etwa 10 ccm zu nehmen, diese werden mit 4 Proz. Nitroprussidnatrium (3 ccm) und mit Piperidin (2 ccm 1 : 10) versetzt. Blauviolette Färbung zeigt Acetaldehyd an. Diese tritt aber nur auf, wenn der Aldehyd in etwas größeren Mengen vorhanden ist; bei sehr geringer Konzentration (1 : 5000 bis 1 : 10000) ist die Farbe bei positivem Ausfall grün. Ist die Verdünnung noch stärker oder ist kein Aldehyd vorhanden, so vertieft sich die ursprüng-

---

[1]) *Rimini*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **43**, 517, 1904.

liche Farbe in Gelb. Es wurde nicht unterlassen, jede Destillation auch qualitativ zu prüfen, wobei sich immer ergab, daß eine Differenz im Jodverbrauch mit einer positiven Reaktion verbunden war, während umgekehrt bei negativem Ausfall der *Rimini*schen Probe auch kein Unterschied gegenüber der Kontrolle (innerhalb der Versuchsfehler) war, so daß wir die Joddifferenz mit Recht als Acetaldehyd umrechnen können.

Versuchsergebnisse.

Wir geben im folgenden einen Auszug aus unseren Versuchsprotokollen. Von den hunderten durchgeführter Versuche mögen die nachstehend angeführten ausgewählten Versuchsreihen nur das früher Gesagte experimentell belegen.

A. Qualitativer Nachweis von Acetaldehyd.

1. Keimlinge.

Die Samen wurden gut gewaschen, 18 Stunden in Leitungswasser quellen gelassen, dann auf feuchtem Filtrierpapier zum Keimen ausgelegt. Waren die Keimlinge etwa 10 cm hoch, so kamen die ganzen Pflänzchen in Dimedon 1 : 500, in flache Schalen, so daß gerade die Wurzeln bedeckt waren. 2 Tage Thermostat bei 27°. Pro Versuch etwa 10 g lufttrockene Samen.

Avena . . . . × [1])
Triticum . . . . × ×
Zea . . . . × bis × ×
Phaseolus . . . . × × „ × × ×
Hordeum . . . . × ×

2. Abgeschnittene Keimlinge.

Die Samen wurden wie oben behandelt. Kräftige grüne Keimpflänzchen, 15 bis 20 cm lang, wurden knapp über dem Samen abgeschnitten und in Dimedon 1 : 500 gestellt. 48 Stunden Thermostat bei 27°.

Triticum . . . . × ×
Hordeum . . . . × bis × ×
Phaseolus . . . . × ×

3. Wurzeln gestutzt.

Um das Eindringen des Dimedon zu erleichtern, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Samen in Dimedon 1 : 1000 keimen gelassen. Nach 4 Tagen wurden alle Wurzeln knapp beim Samen abgeschnitten und die Pflänzchen in Keimschalen in Dimedon 1 : 1000 gestellt. Nach 6 Tagen (bei 18°) war ein Teil der Keimlinge zugrunde gegangen, diese wurden nicht weiter benutzt. Der größere Teil hatte Nebenwurzeln gebildet und sah ganz frisch aus.

Triticum . . . . × × × ×
Hordeum . . . . × × ×
Phaseolus . . . . × × × ×
Pisum . . . . × × ×

---

[1]) × entspricht etwa 1 bis 3 mg, × × 3 bis 5 mg, × × × 5 bis 8 mg, × × × × 8 bis 12 mg.

Zum Vergleich blieben bei einem Teil der Samen unter sonst gleichen Bedingungen die Wurzeln ungestutzt.

Triticum	× ×
Hordeum	× ×
Phaseolus	× ×
Pisum	×

Aus dieser Gegenüberstellung ist wohl klar zu ersehen, wie schwer das Dimedon in größere Zellkomplexe eindringt, wenn es von Zelle zu Zelle diffundieren muß und nicht mit dem Wasser in die geöffneten Leitungsbahnen aufsteigen kann. Es ergibt sich daraus aber auch die Schwierigkeit, in der intakten höheren Pflanze Zwischenprodukte abzufangen, die im Innern der Zelle entstehen, wohin das Abfangmittel nur schwer gelangen kann.

4. Geschälte Samen.

Es wurde versucht, die Samen, wenn sie gequollen sind, zu entschälen, um durch Entfernung der derben, schwer permeablen Samenhaut das Eindringen des Dimedon zu erleichtern. Das ist bei Gramineen infolge ihres anatomischen Baues ganz ausgeschlossen, geht aber recht gut bei gequollenen Leguminosen, die Samenschale läßt sich mit der Pinzette leicht und sauber abziehen. Nur wird, auch bei vorsichtigem Arbeiten, auch leicht die Plumula beschädigt, selbst bei anscheinend unbeschädigten Samen werden die Kotyledonen bald braun, klaffen auseinander usw. Der Eingriff ist doch zu energisch und gab keine besseren Resultate.

Phaseolus	× ×
Pisum	×
Lupinus	× bis × ×

5. Macerate.

Die angekeimten Samen wurden grob (ohne Quarzsand) zerrieben und in reichlich Dimedon 1 : 400 aufgeschwemmt, auf 10 g Samen (Trockengewicht) 300 bis 400 ccm. Von einer Durchlüftung wurde Abstand genommen, da auch kräftige Durchlüftung, wie bereits erwähnt, keine vollständige Aeration herbeiführen kann und auf jeden Fall, im Gegensatz zu den früheren Versuchen (1 bis 4), anaerobe Bedingungen gegeben sind.

Triticum	× × ×
Hordeum	× ×
Avena	× × bis × × ×
Zea	× × ×
Phaseolus	× × × ,, × × × ×
Pisum	× × ×
Lupinus	× × ,, × × ×

Es ist mit vorstehendem jedenfalls erwiesen, daß bei der Keimung der Samen, unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen, Acetaldehyd auftritt. Vorderhand wurden nur einige Gramineen als Vertreter stärkereicher und einige Leguminosen als Vertreter eiweißreicher Samen untersucht, es bleibt einer weiteren Arbeit vorbehalten, die dabei gewonnenen Ergebnisse auch auf die Keimung fetthaltiger Samen auszudehnen.

6. Blätter.

Reich beblätterte Zweige, womöglich junge, weiche, noch nicht stark verholzte Sprosse wurden in Dimedon 1 : 1000 aufsaugen gelassen, 24 Stunden bei 18 bis 20°. Recht praktisch ist es, die Zweige zuerst etwas welken zu lassen, hierauf mit scharfem Messer abzuschneiden und dann erst einzustellen; sie saugen dann rascher und intensiver. Selbstverständlich wurden alle Versuche mit grünen, assimilationsfähigen Organen unter Dunkelsturz aufgestellt.

Syringa vulgaris	× ×
Polygonum sachalinense	× ×
Balsamina sp.	×
Tradescantia guianensis	× × bis × × ×
Eupatorium sp.	× „ × ×
Phaseolus multiflorus	× ×
Sambucus nigra	× × „ × × ×

7. Blättermacerate.

Ähnlich wie die Samenmacerate, siehe 5., angesetzt und verarbeitet.

Syringa vulg.	× ×
Polygonum sach.	× bis × ×
Balsamina	× „ × ×
Tradescantia	× × „ × × ×
Phaseolus	× ×
Sambucus	× ×

8. Blüten.

Ähnlich wie die Blätter siehe 6. Soweit als möglich wurden die Stengel gekürzt und von den Blättern befreit.

Rosa	0 bis ×
Tulipa	× × × „ × × × ×
Paeonia	× × × „ × × × ×
Aesculus	× × ×
Hydrangea	× ×
Narcissus	× „ × ×
Syringa	0 „ ×
Arum	× ×

9. Submerse Wasserpflanzen.

Wurden 4 bis 5 Tage in Dimedon 1 : 1000 gelassen. Längere Versuchsdauer war ausgeschlossen, da die Pflanzen braun wurden und abstarben. Sehr bemerkenswert ist, daß der größte Teil des Kondensationsproduktes in die Flüssigkeit diffundiert (in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Klein* und *Werner* über die Verteilung des Formaldomedons bei Wasserpflanzen in alkalischem Medium), wie aus folgendem hervorgeht:

Elodea canadensis.	Pflanzen	0 bis ×
	Wasser	× × × „ × × × ×
Ceratophyllum sp.	Pflanzen	0
	Wasser	× „ × ×

B. Vorversuche mit reinem Acetaldomedon zur Überprüfung der Titrationsmethode.

1. Destilliertes Wasser, Leitungswasser, Calciumcarbonat (5 g auf 300 ccm Wasser) ändern bei der Destillation den Titer der vorgelegten Bisulfitlösung nicht.

2. Reiner Aldehyd geht quantitativ über.

1,575 mg Acetaldehyd	. . . 1,558 mg	= — 1	Proz.
1,575 „ „	. . . 1,608 „	= + 1	„
1,575 „ „	. . . 1,583 „	= + 0,5	„

Zusatz von $CaCO_3$ ändert nichts am Resultat.

3. Zusatz von Säuren ergibt kolossale Verluste:

a) 10 ccm konzentrierte Phosphorsäure.

11,2 mg Acetaldomedon	. . . 1,365 mg	= — 87	Proz.
11,2 „ „	. . . 1,550 „	= — 86	„

b) 15 ccm konzentrierte Salzsäure.

10 mg Acetaldomedon	. . . 3,29 mg	= — 67,1	Proz.
10 „ „	. . . . 2,86 „	= — 71,4	„
10 „ „	. . . . 1,37 „	= — 86,3	„

c) 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure.

10 mg Acetaldomedon	. . . 2,84 mg	= — 71,6	Proz.
10 „ „	. . . 2,22 „	= — 77,8	„
10 „ „	. . . 2,47 „	= — 75,3	„

Aus diesen Bestimmungen ergibt sich wohl klar, daß Säuren zur leichteren Spaltung des Acetaldomedons absolut ungeeignet sind. Am schlechtesten, wegen der stark differierenden Werte, ist Salzsäure, die beim Destillieren teilweise übergeht und das Sulfit verdirbt, aber auch nicht flüchtige Säuren eignen sich nicht. Die großen Verluste beruhen jedenfalls auf Anhydrisierung des Acetaldomedons, das Anhydrid spaltet beim Destillieren mit Wasserdampf keinen Aldehyd mehr ab.

6. Zusatz von $CaCO_3$ (4 bis 5 g auf 400 ccm Wasser).

11,2 mg Acetaldomedon	. . 8,415 mg	= — 24	Proz.
11,2 „ „	. . . 8,152 „	= — 26	„
7,7 „ „	. . . 6,220 „	= — 19	„
5,6 „ „	. . . 4,376 „	= — 22	„
10,0 „ „	. . . 8,692 „	= — 13	„
10,0 „ „	. . . 8,340 „	= — 16	„

Diese Bestimmungen, die teils mit einer alkoholischen Lösung von Acetaldomedon (wobei nie mehr als 1 ccm Alkohol in Verwendung kam, der unmöglich die Titration stören kann), teils mit festem Acetaldomedon, in Wasser aufgeschwemmt, gemacht wurden, lassen erkennen, daß der Fehler zwar innerhalb gewisser Grenzen schwankt, sich aber etwa um — 20 Proz. bewegt. Es sei nochmals betont, daß es uns weniger darauf ankommt, absolut genau die Menge an Acetaldehyd bestimmen zu wollen — was im physiologischen Versuch schon deshalb unmöglich ist, da nur ein Teil des tatsächlich gebildeten Zwischenproduktes abgefangen werden kann — als vielmehr eine Basis für Vergleichswerte zu haben, die sich sehr wohl geben lassen, wenn man mit einem konstanten Fehler rechnen kann.

7. Eiskühlung der Vorlage verbessert die Resultate nicht.

11,2 mg	8,635 mg	= — 22,8 Proz.
11,0 „	9,426 „	= — 15,3 „
5,6 „	4,590 „	= — 18,0 „

8. Dagegen ist es wichtig, die Dauer der Destillation genau einzuhalten (gerechnet vom ersten Aufwallen an).

10 mg,	5 Minuten	3,62 mg	= — 63,8 Proz.
20 „	5 „	6,83 „	= — 65,8 „
10 „	10 „	4,38 „	= — 56,2 „
20 „	10 „	9,33 „	= — 53,3 „
10 „	20 „	7,66 „	= — 23,4 „
20 „	20 „	15,17 „	= — 24,1 „

C. Quantitative Aldehydtitration.

1. Hefe.

Pro Gefäß 0,5 g käufliche Bäckerhefe in 150 ccm Zuckerlösung. Dimedon 1 : 500 bzw. 2proz. Natriumsulfit, 6 Stunden im Thermostaten bei 32°. Die Dimedonversuche ganz, ohne Fällung und Filtrieren, mit $CaCO_3$ destilliert, die Sulfitansätze filtriert, der Rückstand mit etwas heißem Wasser nachgewaschen, mit $CaCO_3$ destilliert.

3 Proz. Rohrzucker	Dimedon	1,18
3 „ „	Sulfit	1,60
5 „ „	Dimedon	2,68
5 „ „	Sulfit	3,34
10 „ „	Dimedon	3,95
10 „ „	Sulfit	3,78

In allen Versuchen intensive Violettfärbung mit Piperidin-Nitroprussidnatrium.

Die Zahlen bedeuten Milligramm Acetaldehyd, umgerechnet aus dem Jodverbrauch bei der Titration (1 ccm n/100 J = 0,22 mg Acetaldehyd). Sie zeigen deutlich das Ansteigen der Intensität der Stoffumsetzung bei steigender Zuckerkonzentration. Im übrigen wäre es müßig, die ausgedehnten Hefeversuche *Neubergs* um einige weitere bereichern zu wollen; dieser Versuch diente mehr einer vorläufigen Orientierung und sollte zeigen, ob die Methode empfindlich genug ist, Schwankungen in der Bildung von Acetaldehyd auch bei geringsten Mengen Ausgangsmaterials mit genügender Deutlichkeit zum Ausdruck zu bringen.

Die folgenden Versuche (2 bis 12) sind alle in gleicher Weise angelegt. Dimedon 1 : 1000 oder 1proz. Na_2SO_3, sonniges Südfenster im Glashause bei 23 bis 25°, die Blüten nur mit dem Blütenstiel abgeschnitten, die Blätter unter Dunkelsturz, Dauer des Versuchs 6 bis 8 Tage.

Die Verarbeitung ist wie im Text angegeben: fein zerrieben, mit warmer 5proz. Sodalösung extrahiert, filtriert, mit $CaCO_3$ destilliert. Da bei der Destillation außer Acetaldehyd auch andere Substanzen übergehen, wurde je ein Kontrollversuch (ohne Abfangmittel) destilliert und die dabei erhaltene Jodzahl, die, wie sich aus dem negativen Ausfall der *Rimini*schen Reaktion ergibt, nicht als Acetaldehyd gerechnet werden kann, vom Jodwert des eigentlichen Versuchs subtrahiert. Um die Zahlen vergleichen zu können, wurde in jedem Versuch das Frischgewicht der verwendeten Pflanzenmenge bestimmt. Die Zahlen bedeuten: I. Kolonne: Frisch-

gewicht in Grammen; II. Kolonne: Jodwert in Kubikzentimetern korrigierter n/100 Jodlösung (d. i. Differenz aus dem Titer der vorgelegten Sulfitlösung minus dem Jodverbrauch bei der Rücktitration nach beendeter Destillation); III. Kolonne: Ausfall der Piperidin-Nitroprussidnatriumreaktion (××× tief violett, ×× deutlich violett, × deutlich grün, 0 negativ); IV. Kolonne: Kubikzentimeter n/100 J berechnet für 100 g Frischgewicht; V. Kolonne: Differenz zwischen Abfangversuch und Kontrolle in Kubikzentimetern n/100 J; VI. Kolonne: diese Differenz umgerechnet auf Acetaldehyd.

	I	II	III	IV	V	VI
2. Hydrangea hortensis, Blüten.						
Kontrolle	32	4,33	0	13,5	—	—
Dimedon	32	8,18	×	25,5	12,0	2,64
Sulfit	31	7,72	×	24,9	11,4	2,51
3. Tulipa sp., Blüten.						
Kontrolle	17	2,47	0	14,5	—	—
Dimedon	20	7,98	××	39,9	25,4	5,59
Sulfit	18	8,15	××	45,3	30,8	6,78
4. Matthiola sp., Blüten.						
Kontrolle	40	0,86	0	2,1	—	—
Dimedon	33	4.24	×	12,8	10,7	2,35
5. Narcissus poeticus, Blüten.						
Kontrolle	7	1,49	0	21,3	—	—
Dimedon	7	2,14	×	30,2	8,9	1,96
6. Taraxum off., Blüten.						
Kontrolle	85	2,86	0	3,4	—	—
Dimedon	60	3,71	(×)	2,8	2,8	0,62
7. Arum maculatum, Blüten.						
Kontrolle	107	0,13	0	0,1	—	—
Dimedon	108	6,75	××	6,3	6,2	1,36
Sulfit	86	7,67	×	8,6	8,5	1,28
8. Paeonia sp., Blüten.						
Kontrolle	32	1,32	0	4,1	—	—
Dimedon	46	5,34	×	11,6	7,5	1,65
Sulfit	22	3,56	×	16,2	12,1	2,66
9. Iris pseudacorus, Blüten.						
Kontrolle	43	5,60	0	13,0	—	—
Dimedon	50	7,70	×	15,6	2,6	0,57
10. Syringa vulgaris, Blätter.						
Kontrolle	55	10,82	××	18,7	—	—
Dimedon	58	22,61	×××	39,0	19,3	4,25
Sulfit	46	20,66	×××	44,9	25,2	5,54
11. Aster sp., Blätter.						
Kontrolle	50	2,86	0	5,7	—	—
Dimedon	48	3,44	×	7,2	1,5	0,33

12. Myriophyllum proserpinacoides, Luftsprosse.

Kontrolle	32	7,30	0	15,5	—	—
Dimedon	47	7,07	×	22,1	6,6	1,45
Sulfit	28	7,53	×	26,9	11,4	2,51
„ 2proz. Glucose . .	26	8,16	××	31,0	15,5	3,41
„ 2 „ Milchzucker	25	8,67	××	34,6	19,1	4,20

Zur Diskussion dieser Versuchsreihen muß vor allem hervorgehoben werden, daß die besten Resultate mit den intensiv atmenden Blüten erhalten wurden, besonders wenn solche Blüten infolge ihrer großen Oberfläche auch stark transpirieren. Denn für ein befriodigendes Ereignis ist nicht allein eine starke Atmungsintensität maßgebend, sondern auch sehr wesentlich der Umstand, daß das betreffende Organ rasch Wasser aufsaugt, damit das darin gelöste Abfangmittel an den Ort der intensivsten Atmung gelangen und sich dort auswirken kann. Blätter eignen sich — wohl wegen ihrer geringen Atmungsintensität — weniger, dagegen wurden recht gute Resultate mit submersen Wasserpflanzen erzielt. Die besten Erfolge hatten wir auch hier, wie nachfolgende Versuche zeigen, mit Keimlingen.

13. Triticum.

Etwa 6 cm lange, etiolierte Keimpflanzen wurden als ganze (ohne Zerreiben) in Dimedon 1 : 500 gestellt. Versuchsdauer 72 Stunden.

A. Thermostat bei 32°.

Kontrolle	16	0,69	(×)	4,3	—	—
Dimedon	15	5,59	××	37,3	33,0	7,62
„ 1proz. Glucose .	17	10,43	××	61,4	57,1	12,56

B. Kalthaus bei 15 bis 17°.

Kontrolle	20	0,66	(×)	3,3	—	—
Dimedon	14	2,43	×	16,7	13,4	2,95
„ 1proz. Glucose .	15	4,81	××	32,1	28,8	6,34

Der Einfluß der Temperatur auf die Atmungsintensität drückt sich in der Menge des erhaltenen Acetaldehyds ganz gut aus. Beachtenswert ist die beträchtliche Steigerung durch Zugabe von Traubenzucker, in welchem Zusammenhang auch auf die Versuche 12, 16, 17 und 18 hingewiesen sei. Über die diesbezüglich in Gang befindlichen Versuche wird später berichtet werden.

14. Zea Mays.

10 cm lange, unter Dunkelsturz gezogene Keimlinge. Die knapp über dem Samen abgeschnittenen Keimlinge, die Wurzeln und die gestutzten Samen wurden je getrennt angesetzt.

A. Keimlinge.

Kontrolle	17	2,98	—	17,5	—	—
Dimedon	20	3,62	—	18,1	0,6	0,13

B. Samen.

Kontrolle	40	10,50	×	26,2	—	—
Dimedon	40	21,88	×××	54,7	28,5	6,27
„	40	21,70	×××	54,2	28,0	6,16
1proz. Sulfit.	40	20,56	×××	51,1	24,9	5,58

C. Wurzeln.

Kontrolle	17	2,41	0	14,2	—	—
Dimedon	18	3,68	×	20,4	6,2	1,36
1proz. Sulfit	15	3,61	×	24,1	9,9	2,18

Der Versuch zeigt deutlich, daß nur die Samen vermöge ihres Gehalts an abbaufähigen Reservestoffen Acetaldehyd produzieren, gar keiner ist in Versuchen mit abgeschnittenen Keimlingen (etiolierten!) zu finden, und auch die Wurzeln entwickeln relativ schwach. Die bei den einzelnen Organen erhaltenen, recht divergenten Quantitäten zeigen deutlich genug, wie abhängig die Atmungsgröße von der Menge der vorhandenen Kohlehydrate ist.

Am meisten Acetaldehyd konnte auch hier wiederum in Keimlingsmaceraten gewonnen werden, die wie sub A 5 angesetzt und im Thermostaten bei 32° aufgestellt wurden.

15. Zea Mays.

Kontrolle	15	2,64	0	17,6	—	—
Dimedon	16	9,93	× ×	62,0	44,4	9,77
Sulfit	16	9,62	× ×	60,1	42,5	9,35

16. Triticum.

Kontrolle	47	7,72	0	16,4	—	—
Sulfit	42	40,50	× × ×	96,4	80,0	17,60
„ 5proz. Glucose	41	44,70	× × ×	109,0	92,6	20,37

17. Lupinus luteus.

Kontrolle	40	0,00	0	0,0	—	—
Sulfit	40	7,53	× × ×	18,2	18,8	4,14
$CaSO_3$	40	10,09	× × ×	25,2	25,2	5,54
Dimedon	40	9,14	× ×	22,8	22,8	5,02
„ 1proz. Glucose	40	12.03	× ×	30,1	30,1	6,62

Diese Lupinensamen keimten schlecht, die Keimlinge waren nur schwach entwickelt, kaum 1 cm lang; daraus erklären sich die für Samenmacerate auffallend geringen Aldehydmengen. Daß der enzymatische Abbau und die dadurch bedingte optimale Atmungsintensität von gesunden, kräftigen und nicht zu jungen (6 bis 7 cm langen) Keimlingen ganz andere Werte liefert, möge noch folgender Versuch im Gegensatz zum vorigen illustrieren.

18. Vicia sativa.

Kontrolle	30	5,40	0	18,0	—	—
Sulfit	30	28,66	× ×	95,5	77,5	17,05
Dimedon	30	32,90	× ×	109,7	91,7	20,17
„ 2proz. Glucose	30	37,20	× ×	124,0	106,0	23,32

Zusammenfassung.

Trotz großer methodischer Schwierigkeiten wurde versucht, Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Atmung höherer Pflanzen zu greifen.

Als Abfangmittel konnten sowohl Sulfite als auch Dimedon Verwendung finden.

Die Identifizierung des Acetaldehyds erfolgte einerseits durch Mikroschmelzpunktbestimmung des dargestellten Acetaldomedons, andererseits konnte auch eine relativ einfach zu handhabende Methode zur quantitativen Bestimmung selbst kleiner Acetaldehydmengen mittels Bisulfit-Jodtitration gegeben werden.

Alle stark atmenden Pflanzenorgane (Blüten, Keimlinge), aber auch Blätter, Wurzeln usw. der verschiedensten Pflanzen ergaben sowohl bei aeroben wie anaeroben Bedingungen (Keimung, Macerate) Acetaldehyd als Zwischenprodukt.

Damit ist für die Auffassung einer gemeinsamen Reaktionskette der verschiedenen Formen der Atmung, für die Parallelität und den innigen Zusammenhang von aerober, anaerober Atmung und Gärung eine neue, prinzipielle Stütze erbracht.

Gleichzeitig ist gezeigt, daß pflanzliche und tierische Atmung infolge der zentralen Stellung des Acetaldehyds bei beiden einen gemeinsamen Verlauf haben.

Aus den Versuchen ergab sich eindeutig die Abhängigkeit der Atmungsgröße von der Atmungsintensität der verschiedenen Organe (Blüten, Blätter und Wurzeln), von der Menge der verwertbaren Atmungsreserven (grüne und etiolierte Keimlinge, Kotyledonen, Keimpflänzchen, Wurzeln) und die Steigerung durch Zugabe verwertbaren Atmungsmaterials.

Formaldehyd als Zwischenprodukt bei der Kohlensäure-assimilation.

Von

G. Klein und **O. Werner.**

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 30. November 1925.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Von allen Fragen, die sich um das Kernproblem der Pflanzenphysiologie, um den Angelpunkt des Lebens überhaupt, die Kohlensäureassimilation der grünen Pflanze gruppieren, ist die nach den chemischen Vorgängen, die sich bei diesem Prozeß abspielen, am längsten und intensivsten bearbeitet. Am heißesten umstritten ist der Sprung von der Kohlensäure bis zu den bisher allein nachweisbaren Kohlehydraten. Dieser ist chemisch und energetisch zu groß, als daß er auf einmal zurückgelegt werden könnte. Man sucht sich längst ein Bild von dem Reaktionsverlauf der mit Energieaufwand verbundenen Kohlensäurereduktion und der darauf folgenden Synthese zu Kohlehydraten zu machen, und die spezifischen reaktionsfähigen Zwischenstufen, die der Organismus mit seinen spezifischen chemischen Mitteln und seiner charakteristischen Energetik bildet, zu erschließen und aufzufinden. Von allen Möglichkeiten, die im Laufe von 70 Jahren dabei aufgestellt wurden, hat sich die *Bayer*sche Hypothese[1]) der Entstehung von Formaldehyd (1870), vielfach gewandelt, allein behauptet und durch Tatsachen am meisten verdichtet.

Von den vielen hundert Arbeiten, die darauf gerichtet waren, Formaldehyd als Assimilationsprodukt zu erweisen, sind viele rein theoretisch, von den experimentellen Arbeiten die meisten chemisch-analytisch oder -synthetisch, physiologische Beobachtungen recht vereinzelt und unzulänglich. Alle diese Arbeiten wurden zum erstenmal von *Schröder*[2]) (1917) kritisch gesichtet und von *Willstätter*[3]) (1918) vielfach auch experimentell

---

[1]) *A. Bayer*, Chem. Ber. 3, 63, 1870.

[2]) *H. Schröder*, Die Hypothesen über die chemischen Vorgänge bei der Kohlensäureassimilation und ihre Grundlagen. Jena 1917.

[3]) *R. Willstätter* und *Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

überprüft. Das Ergebnis ist rein negativ. Alle geglückten Versuche, mit chemischen oder physikalischen Mitteln aus Kohlensäure Formaldehyd darzustellen, bzw. aus diesem Zucker zu synthetisieren, sprechen für die Hypothese, können aber für die Pflanze nichts beweisen. Alle Arbeiten, auf rein analytischem Wege Formaldehyd aus der Pflanze zu isolieren, erwiesen sich als irrig oder doch für die Assimilation nichts besagend.

Alle physiologischen Versuche, durch Formaldehydfütterung die Bedeutung dieses für die Assimilation sicherzustellen, konnten und können die Hypothese nicht erweisen, wenn auch manche dafür sprechen. Ja *Schröder* wagt auf Grund seiner glänzenden Kritik nicht einmal der Formaldehydhypothese vor anderen den Vorzug zu geben, und erklärt sie als die nur durch den augenblicklichen Wissensstand gegebene, die durch eventuelle künftige Befunde einer angemesseneren Platz machen müßte, wenn sie nicht besser als bisher begründet werden könnte.

Auch *Willstätter*[1]) konnte in der großzügigsten Bearbeitung, die bis jetzt vorliegt, experimentelle Belege für die Entstehung von Formaldehyd nicht erbringen. Er betont mit Recht, daß alle bisherigen Formaldehydbefunde in grünen Organen (abgesehen von allen irrigen Angaben) nichts beweisen, da der Befund allein über den Zusammenhang von Formaldehyd und Kohlensäureassimilation nichts aussagen kann, was neuerdings auch *Benecke*[2]) hervorhebt. Aber auch *Willstätters* Versuche, außerhalb der Pflanze mit Chlorophyll (in verschiedenen Zuständen) im Licht Kohlensäurezerlegung zu erreichen und dabei Formaldehyd oder auch nur eine Peroxydverbindung, die wahrscheinlich primär gebildet wird, zu finden, waren vollständig negativ. Trotzdem postuliert *Willstätter* auf Grund des auch bei stärkster Belastung unverrückbaren Assimilationsquotienten $O_2/CO_2 = 1$, daß die „Kohlensäure desoxydiert wird zur Reduktionsstufe des Kohlenstoffes selbst, d. h. zur Formaldehydstufe". Denn eine Ansammlung von anderen Zwischenprodukten, die bei stärkster Belastung am ehesten erreichbar ist, müßte den Quotienten verschieben, der von den denkbaren Zwischenstufen für Oxalsäure $O_2/CO_2 = 4$, für Ameisensäure = 2 und für Glykolsäure = 1 . 33 (Formaldehyd als einfachstes Hydrat des Kohlenstoffs = 1) ist. Demgegenüber bemerkt *Schröder*[3]) kritisch, daß die Verschiebungen des Quotienten durch derartige Zwischenprodukte unter die *Willstätter*sche Fehlergrenze fallen und demnach am Quotienten nicht bemerkt werden könnten. Nach *Willstätter* bildet sich zuerst eine Chlorophyllkohlensäureverbindung, die durch die Lichtenergie zu einer peroxydischen Verbindung umgelagert wird. — Diese Peroxydstufe ist seither durch *Warburg*[4]) [entgegen früheren abweichenden Anschauungen[5])] und *Noacks*[6]) Modellversuche bekräftigt worden. — Die Peroxydverbindung soll freiwillig unter Mitwirkung eines Enzyms zerfallen und nach Abgabe eines Moleküls O_2 ein Molekül Formaldehyd abgespalten werden. „Es ist eine Annahme von hoher Wahrscheinlichkeit, daß nicht allein die Stufe erreicht, sondern daß Formaldehyd selbst gebildet wird".

[1]) *R. Willstätter* und *Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

[2]) *Benecke-Jost*, Pflanzenphysiologie **1**, 191. Jena 1924.

[3]) *H. Schröder*, Ber. d. bot. Ges. **36**, 9, 1918.

[4]) *O. Warburg* und *U. Tsunao*, diese Zeitschr. **146**, 486, 1924.

[5]) *O. Warburg*, ebendaselbst **100**, 230, 262, 1919; **103**, 188, 1920; Naturwiss. 1921, S. 354.

[6]) *K. Noack*, Zeitschr. f. Bot. **12**, 273, 1920.

Die weitere Annahme einer Kondensation von Formaldehyd zu Zucker ohne Energiezufuhr bietet keine Schwierigkeiten.

Die seither erschienenen experimentellen Arbeiten haben am Stand der Dinge nichts geändert. *Jacoby*[1]) stellte Trockengewichtszunahme an abgeschnittenen Blättern der Kapuzinerkresse, *Sabalitschka*[2]) an intakten Pflanzen von Tropaeolum, Phaseolus und Elodea durch Formaldehydfütterung *auch* im Dunkeln fest. Daß die Pflanzen in diesen Versuchen Formaldehyd in den grünen Organen bei Dunkelheit zu höheren Kohlehydraten „polymerisieren", ist damit noch nicht erwiesen, wie *Sabalitschka* meint, noch weniger, wie er selbst feststellt, die Richtigkeit der Formaldehydhypothese. Die Ergebnisse der anderen Arbeiten[3]) bedürfen keiner besonderen Widerlegung, da sie schon unter *Schröders* und *Willstätters* Kritik fallen.

Es mußte also ein neuer Weg beschritten werden, um das Entstehen von Formaldehyd bei der Assimilation eindeutig zu beweisen.

Der mikrochemische Nachweis im Chloroplasten des assimilierenden Blattes erwies sich als unmöglich.

Schon frühere Versuche, durch Injektion mit dem von *Willstätter* überprüften, auf Formaldehyd spezifisch gestalteten *Schiff*schen Reagens[4]) (Empfindlichkeit 1 : 500000) Formaldehyd im assimilierenden Blatt zu erfassen, zeigten die Unmöglichkeit, auf diesem Wege eindeutige Resultate zu erzielen. Dazu zeigte *Fincke*[5]), daß Formaldehyd, auch künstlich eingeführt, von der Blattsubstanz zerstört oder doch gebunden wird, so daß 30fache Mengen von Formaldehyd, als im Filtrat vom Blattbrei nach Zusatz noch nachweisbar sind, im Blattbrei nicht aufgefunden werden können, was wir bestätigen. Bedeutende Mengen freien Formaldehyds, die man von lebenden Pflanzen aufsaugen läßt oder Blattbrei zufügt, sind auch mit Dimedon nicht mehr nachweisbar (s. S. 366). Auch *Rouge*[6]) hat den mikrochemischen Nachweis von Formaldehyd, Glykol, Glycerinaldehyd und Dioxyaceton in vivo als negativ aufgegeben. Dann zeigte *Brunswik*[7]) rein rechnerisch, daß ein Nachweis von Formaldehyd im Chlorophyllkorn unmöglich sei. Innerhalb einer Sekunde wären im Chlorophyllkorn $0{,}66 \cdot 10^{-10}$ g Formaldehyd faßbar, was für den subtilsten Nachweis um vier Zehnerpotenzen zu gering ist. Selbst die ganze gebildete Tagesmenge ($2{,}4 \cdot 10^{-6}$ g) würde sich, wenn sie auch quantitativ faßbar wäre, wohl nicht lokal sichtbar machen lassen. Hier können wir hinzufügen, daß wir nach Abfangung des Formaldehyds diesen im Chloroplasten vergebens nachzuweisen suchten, denn erstens bleibt das Produkt nicht am Ort des Entstehens und zweitens wäre es unmöglich sichtbar zu machen, da es im Gewebe lipoid gelöst ist und bleibt.

---

[1]) *M. Jacoby*, diese Zeitschr. **128**, 118, 1922.

[2]) *Th. Sabalitschka*, Zeitschr. f. angew. Chem. **35**, 684, 1922; Pharm. Monatsh. **4**, 169, 1923.

[3]) *H. Wislicenus*, Chem. Ber. **51**, 942, 1918; *W. Osterhout*, Amer. Journ. of Bot. 5,5 n.; *Mazè*, C. r. **171**, 1391, 1920.

[4]) *R. Willstätter* und *Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

[5]) *H. Fincke*, diese Zeitschr. **52**, 214, 1913.

[6]) *E. Rouge*, Journ. suisse de Pharm. **59**, 1921.

[7]) *H. Brunswik*, Naturw. **11**, 881, 1923.

Gang der Untersuchung.

Eine eindeutige Lösung schien, wenn überhaupt, nur möglich auf Grund exaktester analytischer Untersuchung, verbunden mit dem einengenden und variierenden physiologischen Experiment, wie es schon *Schröder* betonte. Es mußte also zunächst eine Methode geschaffen werden, die den Nachweis von kleinsten Mengen Formaldehyd eindeutig und sicher gestattet; die aber dazu ermöglicht, das Reagens intra vitam in das assimilierende Blatt bzw. Chlorophyllkorn möglichst ohne Schädigung des Assimilationsapparats einzuführen, um am Orte des Entstehens die flüchtig durcheilte Zwischenstufe Formaldehyd zu fassen und das Reaktionsprodukt zu isolieren und zu charakterisieren. Nach den angeführten errechneten minimalen Mengen, die jeweils entstehen und keinesfalls quantitativ zu erfassen sind, schien von vornherein ein Erfolg nur bei Abfangung und Anreicherung des gesuchten Körpers während längerer Versuchsdauer möglich.

Konnte wirklich Formaldehyd eindeutig gegriffen werden, so sagte dieser Nachweis noch nichts über Ort und Entstehung des Formaldehyds, absolut nichts über seine Genese als Zwischenstufe der Kohlensäureassimilation. Diese konnte nur durch Ausschaltung aller anderen denkbaren Entstehungsmöglichkeiten, durch Einengung der physiologischen Versuchsbedingungen für die spezifische Assimilationstätigkeit bewiesen werden. Ein langer, wenig aussichtsreicher Weg.

Die Möglichkeit für den analytischen Nachweis bot erst der von *Neuberg*[1]) für die Abfangung von Acetaldehyd bei der Gärung und Atmung beschrittene und erprobte Weg, möglichst unschädliche Stoffe in den lebenstätigen Organismus einzuführen, welche die sehr rasch durcheilten Zwischenstufen am Orte der Entstehung abfangen und anreichern. Freilich sind Gärung und Atmung recht unempfindliche Prozesse, die auch im Macerat, im Autolysat ohne regulatorische Wirkung der lebenden Struktur weiter laufen, ja im Prinzip selbst in vitro rein fermentativ durchgeführt werden können. Die Kohlensäureassimilation ist aber nicht nur, wie alle aufbauenden Prozesse, wenigstens bis jetzt, an die lebende, intakt arbeitende Zelle gebunden, sondern auch in ihrem normalen Verlauf und ihrer Intensität von vielen Faktoren im Organismus und im Außenmedium abhängig, gegen geringe Änderungen der optimalen Bedingungen sehr empfindlich[2]).

Von Abfangmitteln kamen einerseits Sulfite, die mit Aldehyd lockere Additionsprodukte geben, andererseits das für Acetaldehyd

[1]) *C. Neuberg*, Ergebn. d. Physiol. **21**, **404**, **1923** (dort die gesamte Literatur).

[2]) *Benecke-Jost*, **1**, 193, 210 ff.

erprobte Dimedon [Dimethylhydroresorcin[1])], das mit Aldehyden beständige, sehr feste Kondensationsprodukte liefert, in Betracht.

Von den geprüften Sulfiten fallen die primären, sauren wegen ihrer Giftigkeit von vornherein weg, auch das bei *Neuberg* für Hefe und Gewebsmacerate bewährte Calciumsulfit ist für uns nicht brauchbar. Einmal müssen die Sulfite, wenn sie Aldehyde koppeln sollen, wegen der labilen Addition immer in starkem Überschuß geboten werden, das Calciumsulfit noch dazu wegen seiner geringen Löslichkeit. So verwendet *Neuberg* für etwa 20 g Hefe oder Lebergereibsel 30 g Sulfit. Solche Mengen sind für die Assimilation unmöglich. Bei Landpflanzen versagt das Sulfit aus wohl mehreren Gründen überhaupt, bei den sonst am besten verwendbaren Wasserpflanzen ist bei den Mengen ungelösten Salzes das Medium so trübe, daß es die Belichtung nie optimal werden läßt, überdies sind diese Konzentrationen bereits schädigend.

Das sekundäre neutrale, leicht wasserlösliche Kalium- und Natriumsulfit ergab positive Resultate, allerdings immer schwächer und unsicherer als die im folgenden zu charakterisierende Dimedonabfangung. Das liegt wohl daran, daß die zur Abfangung nötige Konzentration nicht geboten werden kann, weil bei 1 : 200 schon Schädigung der Assimilation eintritt, die vielleicht nicht nur durch den spezifischen Chemismus, sondern auch durch die hohe Salzkonzentration bedingt ist. Dazu kommt endlich der langwierige Aufarbeitungsgang, von dem später zu sprechen sein wird.

Am besten bewährte sich *Dimedon.* Dimedon gibt mit Formaldehyd ein sehr unlösliches Kondensationsprodukt (Formaldomedon), Löslichkeit in 100 ccm Wasser bei 19° C 1 mg[2]). Die Erfassungsgrenze liegt bei 0,1 mg, die Empfindlichkeit ist allerdings infolge der relativ beträchtlichen Löslichkeit nicht sehr hoch, was aber für unsere Zwecke (bei Makrodarstellung) nicht prinzipiell störend ist. Denn unterhalb einer gewissen Grenze (1 mg) sind die Mengen methodisch schon zu klein und nichtssagend, oberhalb dieser ist das charakteristische Kristallisationsprodukt sicher zu erfassen. Wesentlicher zur Abfangung ist die hohe Reaktionsgeschwindigkeit, die wir daraus erschließen, daß aus gesättigter wässeriger Dimedonlösung (1 : 200) mit einem Tropfen 20proz. Formollösung sofort Trübung und Kristallfällung eintritt (s. auch S. 377), woraus wir auch wohl in verdünnten Lösungen, wo das Kristallprodukt erst später fällt, auf momentane Koppelung schließen können. Dazu kommt noch der Befund, daß auch kleinste, genau

[1]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **106**, 281, 1920.
[2]) *Vorländer*, Chem. Ber. **30**, 1801, 1897; Liebigs Ann. **294**, 252, 1897; *Joh. Volkholz*, Diss. Halle 1902.

gemessene Mengen (einige Milligramm) freien, oder an Dimedon gebundenen Formaldehyds im Dimedon (unter erprobter Versuchsanstellung) erfaßt werden können.

Da aber das Dimedon als lipoidlöslicher Körper ein, wenn auch nicht sehr starkes Narkoticum ist und die Kohlensäureassimilation sich nach *Warburg*[1]) gegen Narkotica tausendmal empfindlicher erweist als die Atmung, mußte erst die Konzentration gesucht werden, die den Prozeß noch nicht sehr alteriert, aber doch noch zur Abfangung wenigstens eines Teiles des Zwischenproduktes hinreicht. Wenn also überhaupt Formaldehyd als Zwischenprodukt greifbar war, mußte mit Mengen gerechnet werden, die eventuell um einige Zehnerpotenzen niedriger waren, als die von *Neuberg* bei der großen Umsetzungskapazität der Gärungsorganismen, bei in demselben Versuch wiederholt erneuertem Gärgut und einer von ihm gewählten Dimedonkonzentration von 1 : 200 bis 1 : 40 erreichten Mengen (0,4 bis 4 g). Zeigte doch auch schon der nach unserer Durcharbeitung erschienene Aldehydnachweis bei der Atmung der Warmblütler nur mehr Milligramm. Als brauchbarste Konzentration erwies sich 1 : 1000, bei der die Assimilation durch einige Stunden ungehemmt verläuft, um dann rasch zum Stillstand zu kommen.

Zur Darstellung des entstandenen Produkts waren die *Neuberg*schen Methoden nicht geeignet. Nicht das Extrahieren der Gärmasse und Ausfällen des Produkts aus dem eingeengten Extrakt, da unsere Mengen hierfür viel zu klein sind (s. S. 363) und immer lipoid gelöst bleiben. Auch nicht das Abdestillieren des Formaldehyds aus der ganzen Versuchsmenge + Flüssigkeit, da das Formaldomedon, wie sich bald zeigte, aus größeren Flüssigkeitsmengen nicht oder kaum Formaldehyd abspaltet. Die Destillation ist für Formaldehyd nur aus Sulfitbindung möglich. Dagegen ließ sich das Formaldehydprodukt aus der Pflanze durch Extraktion, Einengen und Ausschütteln reinigen und konzentrieren. Bei Wasserpflanzen zeigte sich bald, daß das Formaldomedon nicht am Orte des Entstehens bleibt, sondern langsam ab- und in das Außenmedium diffundiert, wohl gelöst in den Lipoiden, die in beträchtlicher Menge in die Lösung gehen. Dies im sauren wie alkalischen Medium, in letzterem allerdings in wenigen Stunden fast quantitativ. Da die natürliche Nährlösung der Wasserpflanzen schon neutral oder schwach alkalisch ist, und bei der Assimilation durch Zerlegung des Bicarbonats das p_H rasch über 8 bis 9 und mehr steigt[2]), ist nach Abbrechen und eventuellem Stehenlassen des Versuchs alles Form-

[1]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 230, 262, 1919; **103**, 188, 1920; Naturwiss. 1921, S. 354.

[2]) *Fr. Ruttner*, Sitzber. d. Akad. Wiss. Wien, math.-natur. Kl. I, **130**, 171, 1923.

aldomedon in der Nährlösung, aus der es ausgeschüttelt und angereichert wird. Die Möglichkeit, die minimalen Mengen Reaktionsprodukt aus dem großen Quantum Nährlösung (½ bis 2 Liter) darzustellen (s. S. 375), beruht auf dem Prinzip, durch Einengung auf 1 bis wenige Kubikzentimeter das Produkt um mindestens das Tausendfache anzureichern. Aus der geringen Flüssigkeitsmenge läßt sich das Produkt dann gereinigt destillieren, abscheiden und charakterisieren. Um Wiederholungen möglichst zu vermeiden, wird die nach Hunderten von Vor- und Fehlversuchen bewährte Versuchsanstellung in extenso später gegeben. Daß die Wahl des Versuchsobjekts dabei wesentlich war und die Durcharbeitung nur bei den mit der ganzen Oberfläche submersen Wasserpflanzen möglich wurde, sei nur nebenbei betont.

Die Mengen, die erhalten wurden, sind absolut sehr gering, relativ aber recht befriedigend, sowohl im Vergleich mit *Neubergs* Mengen bei der Atmung der Warmblüter, wie auf Grund der theoretisch berechneten Mengen. An einem Beispiel soll das gezeigt werden: 10 g Frischgewicht von Elodea entsprechen etwa 0,4 g Trockengewicht, 8 mg Chlorophyll und diesem bei guter Assimilation 0,05 g assimilierter Kohlensäure pro Stunde; dieser entsprechen 33 mg Formaldehyd bzw. 300 mg Formaldomedon. Abfangbar sind 8 bis 12 mg in 2 Stunden, also ungefähr der 60. Teil der theoretisch entstandenen Menge. Bedenkt man dabei, daß in diesen 2 Stunden optimale Assimilation nicht herrschen kann, weil ja das eindringende Narkoticum immer stärker hemmt, daß erst von einer gewissen Zeit an das Dimedon im Chloroplasten die Konzentration erreicht hat, die abfangend wirkt, daß das Dimedon überhaupt nicht in einer optimal abfangenden Konzentration gegeben werden kann, so erhält man erst eine Schätzung für die überhaupt abfangbare Menge. Hierzu kommt aber noch, daß die Formaldehydstufe anscheinend so schnell durchlaufen wird, daß überhaupt nur bei voller Belastung des Assimilationsapparats ein Teil greifbar wird. Denn wie später noch zu zeigen sein wird, wurde bei schwächerer Assimilation Formaldehyd nie in greifbarer Menge gefunden. Dies alles gibt uns die Berechtigung, von optimaler Ausbeute zu sprechen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen allerdings nur, daß bei voller Assimilation Formaldehyd gefunden und eindeutig nachgewiesen werden kann. Ob dieser, wie bisher stillschweigend vorausgesetzt, aus der Reaktionskette der Assimilation stammt, ist erst noch zu erweisen.

Wenn auch festgestellt werden muß, daß zum erstenmal Formaldehyd aus der Pflanze, noch dazu aus der intakten Pflanze, eindeutig nachgewiesen wurde, und auch in Mengen, die die weniger sicheren Angaben früherer Forscher weit übertreffen [*Curtius* und

Franzen[1]) aus 1 kg Hainbuchenblätter 0,86 mg gegenüber unserer Ausbeute von 10 mg aus 10 g!], so wäre doch die Entstehung des Formaldehyds unabhängig von der Assimilation auf verschiedene Weise denkbar. Die naheliegendste Möglichkeit wäre die, an Verunreinigungen des Arbeitsraumes bzw. der Reagenzien zu denken. In der Tat ist die Gefahr der Verunreinigung groß. Das Öffnen einer Flasche mit konzentrierter Formaldehydlösung genügt, um in einer irgendwo im Zimmer stehenden Schale mit Dimedonlösung Formaldehyd nachweisen zu können. Auch der nicht speziell gereinigte Alkohol enthält Aldehyd. Da die Reinheit des Versuchsraumes und der Reagenzien jeweils überprüft wurde, fällt diese grobe Fehlerquelle weg, zumal ja dann Formaldehyd als Verunreinigung regelmäßig und einheitlich hätte gefunden werden müssen *). Dagegen war der Einwand, daß Formaldehyd sonst irgendwie unter den gegebenen Verhältnissen in der Pflanze entstehen könnte, nicht so leicht von der Hand zu weisen. Deshalb wurden chlorophyllfreie Organe in toto zerschnitten und als Gereibsel (Kartoffelknollen, Mark von Impatiensstengeln, Weizen und Erbsensamen und etiolierte Keimlinge dieser, Rübenstücke von Beta vulgaris, Keimlingswurzeln usw.) in der bei der Assimilation verwendeten Lösung mit Dimedon auch unter sonst gleichen Bedingungen im Lichte und im Dunkeln tagelang belassen, auf Formaldehyd geprüft. Die Ergebnisse waren immer rein negativ. In manchen Versuchen war Aldehyd greifbar, der aber mikrochemisch eindeutig als Acetaldehyd aus der Atmung der verwendeten Pflanzen zu charakterisieren war. Eine Formaldehydabspaltung durch Autolyse oder Photolyse tritt also in unseren Versuchen nicht ein. Ebenso war eine photolytische Abspaltung von Formaldehyd aus Chlorophyll oder dessen Begleitstoffen möglich (s. *Willstätters* Kritik der Formaldehydabspaltung aus Chlorophyll). Gereibsel, Alkohol- und Petrolätherauszüge von Elodea und allen anderen zur Assimilation verwendeten Pflanzen gaben unter den Assimilationsbedingungen nie Spuren von Formaldehyd.

Dazu wurden noch spezielle Literaturangaben für unsere Verhältnisse überprüft. So fand *Spoehr*[2]), daß Preßsaft von Sukkulenten nach Belichtung Säureabnahme und im „Destillat" Formaldehyd und Ameisensäure zeigt. Ebenso konnte er nach Behandlung von Äpfelsäure, Weinsäure, Essigsäure,

---

[1]) *Th. Curtius* und *H. Franzen*, Sitzber. d. Heidelb. Akad. Wiss. 1912, 7. Abh.

[2]) *H. A. Spoehr*, diese Zeitschr. 57, 95, 1913.

*) Auch die Möglichkeit, daß im Gang der Aufarbeitung oder durch Belichtung aus *Dimedon* Formaldehyd abgespalten wird, wurde überprüft. Reine Dimedonnährlösung + CO_2 spaltet auch nach 24stündiger Belichtung keine Spur Aldehyd ab, beim Destillieren geht Dimedon als solches zum Teil (unzersetzt) über. Übrigens hätte eine derartige Fehlerquelle *immer* stören müssen.

Glykolsäure usw. im ultravioletten Licht bei 30° und starker Sauerstoffzufuhr als Produkt der langsamen Decarboxylierung Formaldehyd und Acetaldehyd „qualitativ“ nachweisen. Der daraus gezogene Schluß, daß im Pflanzenkörper „photolytisch“ aus organischen Säuren Formaldehyd gebildet wird, der auch in die Literatur übernommen wurde (s. *Benecke-Jost*, S. 191, Anm. 91), ist aber schon durch nichts bewiesen. Denn erstens liegen nur Ergebnisse aus Preßsäften und Destillaten vor und zweitens ist die Behandlung in vitro recht radikal. Versuche mit farblosem und grünem Pflanzengereibsel, dem Oxalsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure, Äpfelsäure einzeln und in Mischung zugesetzt war (0,01 bis 1 Proz.), gaben bei Dimedongegenwart unter den Assimilationsbedingungen keinen Formaldehyd. Versuche mit reinen Substanzen unter diesen Bedingungen ergaben negative Resultate (s. Tabelle V). Auch Fe- und Mn-Katalyse[1]) ergaben bei dieser Versuchsanstellung keinen Formaldehyd (*Willstätter*, S. 376), [nach *Moore* und *Webster*[2]) soll CO_2 durch Fe-Katalyse zu Formaldehyd reduziert werden, was von *Spoehr* negiert wurde[3])], höchstens Acetaldehyd, wie ihn auch *Neuberg*[4]) in vitro gefunden hatte. Beigabe von Fe- und Mn-Salzen steigerte auch bei normaler Assimilation die Formaldehydausbeute nicht. *Wislicenus*[5]) zeigte, daß die früheren Vermutungen, wonach sich H_2O_2 mit CO_2 zu Formaldehyd und Ozon umsetzt, zwar nicht zutreffen, dafür aber Alkalibicarbonate durch H_2O_2 zu Ameisensäure reduziert werden. Formaldehyd konnte er weder da, noch bei Behandlung von Ameisensäure mit H_2O_2 finden. „Die Pflanze findet dagegen im allgegenwärtigen H_2O_2 das Reduktionsmittel, das die CO_2 zur ersten Reduktionsstufe, der Ameisensäure, ohne Energieaufwand hebt!“ Die weitere Reduktion soll im Chlorophyllkorn mit Lichtenergie verlaufen. Dazu ist nur zu bemerken, daß das ganze auf *Kleinstücks*[6]) Irrtum beruht und H_2O_2 oder überhaupt ein Peroxyd nach *Molisch*[7]) bisher nie in der Pflanze gefunden wurde.

Trotzdem wurden Blattgereibsel mit H_2O_2 (0,1 bis 10 Proz.) im Lichte und im Dunkeln auf Formaldehydbildung geprüft, das Ergebnis war vollständig negativ. Bei normaler Assimilation hemmt Zugabe von H_2O_2 in steigender Konzentration (0,1 bis 10 Proz.) die Formaldehydbildung.

Schließlich wäre noch eine Fehlerquelle aufzuzeigen, auf die der eine von uns a. a. O.[8]) gestoßen war. Zuckerlösungen (Glucose, Fructose, Saccharose usw.) spalten nämlich bei der Destillation Formaldehyd ab, der übergeht und im Versuch Assimilation vortäuschen könnte. Allerdings treten greifbare Aldehydmengen erst bei einer Konzen-

---

[1]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 230, 262, 1919; **103**, 188, 1920; Naturwiss. 1921, S. 354.

[2]) *B. Moore* und *T. A. Webster*, Proc. Roy. Soc. Sir. B. **87**, 163, 1913.

[3]) *H. A. Spoehr*, diese Zeitschr. **57**, 95, 1913.

[4]) *C. Neuberg*, ebendaselbst. **67**, 58, 1914.

[5]) *H. Wislicenus*, Chem. Ber. **51**, 942, 1918; *W. Osterhout*, W. J. **5**; Amer. Journ. of Bot. **5**, 5 n ; *Mazè*, C. r. **171**, 1391, 1920.

[6]) *Kleinstück*, Chem. Ber. **51**, 108, 1918.

[7]) *H. Molisch*, diese Zeitschr. **125**, 257, 1921.

[8]) *G. Klein*, Aldehydabspaltung an Zuckerarten. Diese Zeitschr. **1926**.

tration von mindestens 1 Proz. Zucker auf, wie sie im assimilierenden Organ nie vorkommt. Kontrollversuche mit 1 bis 5 Proz. Zuckerzugabe zeigten aber, daß diese Fehlerquelle nicht in Betracht kommt, da der Zucker beim Ausschütteln mit Petroläther auch nicht in Spuren übergeht. Auch Belichtung von Zuckerlösungen allein und Pflanzengereibsel zugesetzt, ergab weder mit noch ohne katalytische Fe-Gabe Formaldehyd.

Um auch im assimilierenden Organ diese eventuell störende photolytische Abspaltung von Formaldehyd aus organischen Säuren oder Zucker ausschalten zu können, wurden überdies noch folgende Versuche durchgeführt. Normaler Assimilations- (Licht-) bzw. Atmungsdunkelversuch mit Wasserpflanzen bei gleichzeitiger Darbietung von 1 bis 2 Proz. Glucose. Der Zucker wurde 1 Stunde vor Versuchsbeginn im Dunkeln zugesetzt, Dimedon erst zu Versuchsbeginn. Da Zuckerzufuhr, wie bekannt, die Assimilation hemmt, und *Warburg* dabei eine Verdrängung reaktionsfähiger CO_2 in den Chloroplastengrenzschichten annimmt, war schwächeres Auftreten von Formaldehyd zu erwarten. Der Dunkelversuch mußte nach unseren Atmungsuntersuchungen gesteigerte Aldehydproduktion ergeben.

De facto zeigten die Versuche regelmäßig beträchtlichere Mengen Acetaldehyd als normale Assimilationsversuche, aber auch mehr Formaldehyd, als erwartet war. Bei einem Zuckergehalt von mehr als 1 Proz. nahm allerdings die Formaldehydmenge ab. Hier dürfte bereits Hemmung durch Zuckerüberschuß vorliegen. Die immerhin relativ beträchtlichen Mengen Formaldehyd, die einheitlich in den diesbezüglichen Versuchen auftreten, können wir uns nur aus der Hemmung des Assimilationsmechanismus erklären, einer Verlangsamung des ganzen Prozesses, die als einzige Möglichkeit einer reichlicheren Formaldehydabfangung erscheint.

Daß Formaldehydabspaltung des Zuckers direkt nicht vorliegt, zeigen die folgenden Versuche.

Es wurden Assimilationsversuche bei Narkose mit Phenylurethan bzw. Blausäurewirkung unter gleichzeitiger Darbietung von 1 bis 2 Proz. Zucker bzw. der Ammonsalze von Oxal-, Äpfel- und Weinsäure (je 0,1 Proz.) durchgeführt. Da nach den folgenden Versuchen mit Phenylurethan und Blausäure (S. 371) Formaldehyd aus der Assimilation nicht oder kaum auftreten konnte, mußten die Versuche eindeutig zeigen, ob unter den Bedingungen des Assimilationsversuchs in vivo aus Zucker bzw. organischen Säuren Formaldehyd entsteht. Die Ergebnisse waren rein negativ. In keinem der Versuche konnte Formaldehyd gegriffen werden, wohl aber manchmal geringe Mengen Acetaldehyd aus der nicht ganz sistierten Atmung.

Damit erscheinen die Fehlerquellen, die uns möglich schienen, ausgeschaltet.

Das Hauptgewicht legen wir indes auf die physiologischen Versuche, die Formaldehydbildung auf die Kohlensäureassimilation einzuengen. Hierzu wurden Parallelversuche im Dunkeln mit CO_2, normale Versuche im Licht und Belichtungsversuche im kohlensäurefreien Raume angestellt. Die Dunkelversuche ergaben nur Acetaldehyd von der Atmung, ebenso die kohlensäurefreien Belichtungsversuche nur Acetaldehyd neben hier und da greifbaren Spuren von Formaldehyd, der wohl nur auf die mit dem Dimedon eingeführten und von der Atmung stammenden Kohlensäuremengen zurückgeführt werden kann. Dazu kommt der schon erwähnte Befund, daß bei schwächerer Assimilation (Licht, CO_2 oder Temperatur im Minimum) Formaldehyd nie in greifbarer Menge erhalten werden konnte, ebensowenig bei nicht vollkräftigen Wasserpflanzen oder starker Verschiebung eines der limitierenden genannten Faktoren beim Versuch gegenüber der Vorbehandlung[1]) (s. *Benecke-Jost* **1**, 198 bis 218).

Um aber das Ergebnis des kohlensäurefreien Versuchs, das doch kritisiert werden könnte, absolut beweiskräftig zu gestalten, wurde versucht, bei Kohlensäuregegenwart den Assimilationsapparat zu inaktivieren. Das ließ sich nach *Warburg*[2]) durch entsprechende Narkose und durch Blausäurebehandlung erreichen.

Schon die Dimedonbehandlung bedeutet ja eine schwache Narkose, die sich nach einigen Stunden auswirkt und die Assimilation vollständig sistiert. Wirkt Dimedon schon im normalen Versuch (1 : 1000) limitierend auf die erreichbare Formaldomedonmenge, so hemmt es in einer Konzentration 1 : 200 vollständig; in Konsequenz dessen ist Formaldehyd nicht greifbar. Dasselbe wurde bei optimaler Assimilation durch Narkose mit Phenylurethan erreicht (1 : 1000). Es ist keine Spur von Formaldehyd, wohl aber wenig Acetaldehyd von der nur teilweise alterierten Atmung auffindbar. Dasselbe Ergebnis brachten Blausäureversuche (Konzentration n/1000, welche die Assimilation vollständig hemmt, die Atmung aber nicht nur nicht hemmt, sondern sogar beschleunigt): Kein Formaldehyd, normale Mengen Acetaldehyd.

Endlich wurde im Anschluß an die Befunde *Stoklasas*[3]) die in ihrer Wirkungsweise noch nicht näher erkannte assimilationssistierende Wirkung der schwefligen Säure zur Beweisführung herangezogen. Vorhergehende Einwirkung von SO_2 in einer Konzentration von

---

[1]) *R. Harder*, Jahrb. f. wiss. Bot. **64**, 169, 1924.

[2]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 230, 262, 1919; **103**, 188, 1920; Naturwiss. 1921, S. 354.

[3]) *J. Stoklasa*, Die Beschädigung der Vegetation durch Rauchgase. Berlin 1923; diese Zeitschr. **136**, 306, 1923.

0,0005 proz. $NaHSO_3$ durch 26 Stunden und von 0,01 proz. $NaHSO_3$ durch 2 Stunden ergab weder Form- noch Acetaldehyd.

Durch diese letzten Versuche, deren Einwirkung ja ganz verschiedene Komplexe und Strukturen des feineren Assimilationsapparats außer Tätigkeit setzt, scheint uns im Zusammenhang mit den obigen Befunden der sichere, eindeutige Beweis erbracht, daß der nachgewiesene Formaldehyd faktisch nur als Zwischenstufe bei der Kohlensäureassimilation anzusprechen ist.

Methodisches.

Bei der Auswahl des Versuchsmaterials mußten wir von folgenden leitenden Gesichtspunkten ausgehen:

1. Es kommen vor allem solche Pflanzen in Frage, bei denen das Abfangmittel Dimedon dem assimilierenden Gewebe auf kürzestem Wege zugeführt werden kann.
2. Die Assimilationsintensität des Materials muß eine möglichst große sein.
3. Die Pflanzen werden um so geeigneter sein, je weniger ihre Assimilationsintensität durch die narkotische Wirkung des lipoidlöslichen Dimedons herabgesetzt wird.
4. Das Ausgangsmaterial soll möglichst frei von solchen Stoffen sein, die die Isolierung des Reaktionsprodukts Formaldomedon erschweren.

Danach kamen in erster Linie Wasserpflanzen in Betracht. Submerse Wasserpflanzen, wie Elodea canadensis und densa, Myriophyllum sp., Ceratophyllum sp., Ranunculus aquatilis, Utricularia vulgaris, Potamogeton praelongus, waren wegen der Exposition ihrer ganzen Oberfläche gegenüber der Nährlösung, die das Dimedon gelöst enthält, besonders günstig. Auch ist die Dimedonkonzentration, welche diese Pflanzen vertragen, besonders bei Elodea, Myriophyllum und Potamogeton, eine relativ hohe. Wir verwendeten in der Regel für Material, dessen Assimilationsfähigkeit maximal war, eine Dimedonlösung 1 : 1000, eine Konzentration, welche die Assimilationsfähigkeit wenig herabsetzt und hinreichend ist, um einen beträchtlichen Teil des Formaldehyds abzufangen. Nicht zu unterschätzen ist hier auch der Vorteil, die Assimilationstätigkeit des Materials von Fall zu Fall durch die Beobachtung der aus den Schnittflächen der Sprosse austretenden Gasblasen, genauer durch Leitfähigkeitsbestimmungen, auch während des Versuchs schnell und sicher beurteilen zu können.

Von submersen Wasserpflanzen bewährten sich einzellige und Fadenalgen weniger. Bei Versuchen mit Chlorella, Spirogyra, Zygnema und Vaucheria zeigte sich nämlich eine große Empfindlichkeit dieser Organismen gegen Dimedon. Trotz ihrer optimalen aufnehmenden Oberfläche sind die anwendbaren Dimedonkonzentrationen 1 : 3000 bis 1 : 5000 zu gering, um genügend Formaldehyd abfangen zu können. Dazu

wären auch bedeutende Mengen von Algen und entsprechende Exposition notwendig gewesen. Nur in wenigen günstigen Fällen waren hier kleine Mengen von Formaldomedon aus Assimilationsversuchen zu gewinnen.

Bei den Landpflanzen war die Schwierigkeit der Zuführung von Dimedon zu den assimilierenden Zellen eine viel größere als bei den Wasserpflanzen. Bei Versuchen durch einen 10 cm langen, jungen Sproß von Aucuba japonica, der auf dem kürzeren Schenkel eines ungleichschenkligen U-Rohres montiert war, Dimedonlösung 1 : 2000 mit einer Quecksilbersäule durchzupressen, erwiesen sich die Tropfen, welche an den Blattzähnen austraten, frei von Dimedon. Schon dieser Versuch zeigt, wie groß die Absorption des Dimedon auf dem Wege durch die Leitungsbahnen ist[1]). Immerhin war es bei Verwendung von abgeschnittenen Blättern auf dem kurzen Wege durch den Blattstiel oder den unteren Blatteil möglich, Dimedon in das Assimilationsgewebe zu bringen. Die Auswahl des Versuchsmaterials wird aber durch den bei vielen Pflanzen unter der schädigenden Wirkung des Dimedon (Wirkung des Narkoticums und der sauren Reaktion des Dimedon, p_H der Nährlösung = 8, der Nährlösung + Dimedon = 4,5) leicht eintretenden Spaltenverschluß eine sehr kleine. Je länger die Spaltöffnungen geöffnet bleiben, desto mehr Dimedon kann mit dem Transpirationsstrom in das Blatt nachgesaugt werden. Als brauchbare Versuchsobjekte erkannten wir Blätter von Tropaeolum majus, Zea Mais und fertile, junge Sprosse von Equisetum palustre. Um künstlich die Spalten offen zu halten, versetzten wir nach entsprechenden Vorversuchen die Dimedonlösung mit 0,1 proz. NaCl[2]). Bei dieser Konzentration waren die Spalten trotz der Dimedonwirkung nach 10 Stunden noch offen.

Eine andere Möglichkeit der Zuführung von Dimedon zum Assimilationsgewebe war bei einigen Sukkulenten, vor allem Sempervivum tectorum und Echeveria Scheideckeri, durch Injektion von Dimedonlösung in das Interzellularsystem gegeben. Wir gingen so vor, daß wir am Grunde des Blattes mit einer Nadel einen Einstich machten und dann mit einer *Pravaz*schen Spritze an der Blattspitze injizierten. An der Verfärbung im Grünton des Blattes kann man die Erfüllung des Interzellularsystems mit der Flüssigkeit sehen. Diese wird allmählich resorbiert und damit der Luftkohlensäure das Eindringen möglich gemacht. Auch hier bewährte sich zur Verhinderung des Spaltenverschlusses Zugabe von 0,1 proz. NaCl zur Dimedonlösung. Die Dimedonkonzentrationen sind ebenso wie bei den Aufsaugversuchen hoch zu nehmen, 1 : 200 bis 1 : 500. Auch diese Versuche mit Sempervivum und Echeveria führten zu günstigen Resultaten.

---

[1]) *H. Fincke*, diese Zeitschr. 52, 214, 1913.
[2]) *F. Weber*, Naturwiss. 11, 309, 1923.

Als Lichtquelle benutzten wir, um uns von der Unbeständigkeit des Sonnenlichtes unabhängig zu machen, künstliches Licht. Wir arbeiteten nach *Willstätters* bewährtem Muster mit einer 2000-MK-Metallfadenlampe[1]) bei Lichtintensitäten von 40000 bis 100000 Lux (Sonnenlichtstärke im Juni). Um die beträchtliche Wärmeausstrahlung abzuhalten, schalteten wir zwischen Lichtquelle und Versuchspflanzen eine Kühlvorrichtung, bestehend aus einer runden, 5 cm hoch wassergefüllten Glaswanne, auf deren Boden Kühlrohre, ebenfalls aus Glas, gelegt sind (Abb. 1). Die Temperatur des Wassers in einem 20 cm unter der Lichtquelle aufgestellten Gefäß steigt bei dieser Anordnung im Laufe von 12 Stunden höchstens um 1 bis 2° C. Die Kühlung ist also bei sehr guter Lichtausnutzung eine optimale.

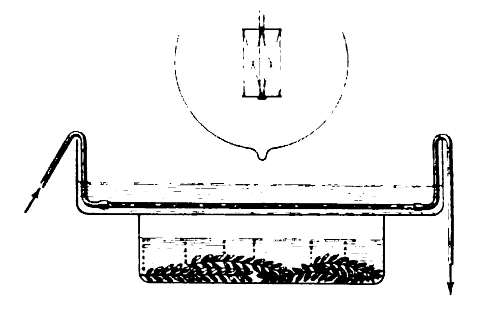




Abb. 1. Assimilationsapparatur.

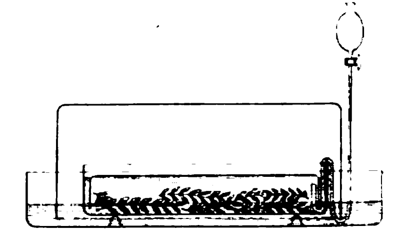


Abb. 2. Assimilationskammer beim CO_2-freien Versuch.

Im folgenden sei der Gang eines Versuchs mit Elodea canadensis genauer beschrieben. Die Pflanzen werden in der wärmeren Jahreszeit von einem natürlichen Standort, wo sie üppig gedeihen, genommen und ein bis mehrere Tage im lichten Glashaus in einem hinreichend großen Gefäß mit Leitungswasser unter öfterem Zusatz von Kohlensäure stehengelassen. Zum Versuch werden bloß die gesunden, grünen Sproßspitzen in einer Länge von 5 bis 10 cm mit dem Rasiermesser abgeschnitten. Zu anderen Jahreszeiten müssen sie erst optimal adaptiert werden[2]).

Als Gefäße werden Bechergläser oder flache Schalen mit einem Fassungsraum von 400 bis 1000 ccm benutzt. Das Gefäß muß die gleichmäßige Belichtung einer größeren Elodeamenge in möglichst wenig Lösung gestatten. Da das Reaktionsprodukt aus der Pflanze während des Versuchs zum größten Teil in die Nährlösung diffundiert, ist zur Isolierung des Produkts eine möglichst hohe prozentuale Anreicherung wünschenswert. Als besonders günstige Beleuchtungsanordnung hat sich für unsere Zwecke die in Abb. 2 innen dargestellte

[1]) ½-Watt-Metallumlampe.
[2]) *R. Harder*, Jahrb. f. wiss. Bot. **64**, 169, 1924.

erwiesen; eine flache Glasschale von 750 ccm Fassungsraum, die in umgekehrter Lage in einer größeren Schale liegt, enthält die Dimedonlösung mit Elodea. In der größeren Schale wird die Dimedonlösung bis auf 0,5 cm Höhe abgehebert. Hier wird das bei flachen offenen Schalen sonst so lästige Heraussteigen der Elodeasprosse aus der Flüssigkeit und Vertrocknen der Pflanzen vermieden.

Die verwendete Nährlösung enthält 0,1 Proz. Dimedon in Leitungswasser mit einem Zusatz von 10 bis 20 Proz. durch Einleiten von CO_2 in Kalkmilch frisch bereiteter Calciumbicarbonatlösung als CO_2-Quelle und zur Pufferung. In vielen Fällen haben wir auch nur das stark $CaCO_3$-haltige Wiener Leitungswasser mit einem CO_2-Strom durchperlt. Die Temperatur muß dieselbe sein wie die des Wassers, in dem sich die Pflanzen vorher befanden, und soll während des Versuchs möglichst konstant bleiben. Man belichtet 6 bis 8 Stunden. Bei gutem Elodeamaterial macht sich die narkotische Wirkung des Dimedons erst nach ungefähr 2 Stunden oder noch später bemerkbar. Bis dahin aber muß die Gasblasenentwicklung eine volle sein, wenn größere Mengen von Formaldehyd abgefangen werden sollen. Ist die Belichtung beendet, so werden Lösung und Pflanzen getrennt verarbeitet. Von der Verarbeitung der Pflanzen soll erst später die Rede sein, da diese erfahrungsgemäß nur mehr einen kleinen Bruchteil Formaldomedon enthalten, also auch verworfen werden können.

Die Lösung wird filtriert, mit einigen Tropfen konzentrierter HCl angesäuert und gegen eine größere Menge Petroläther tüchtig ausgeschüttelt (1 Stunde). Für 1 Liter der Lösung ist ungefähr ½ Liter Petroläther zu nehmen.

Dieser bewährte sich besser als Äther oder andere organische Solventien, die mit Wasser in höherem Verhältnis mischbar sind. Bei alkalischer Reaktion der wässerigen Schicht liegt in allen Fällen infolge der spielenden Alkalilöslichkeit des Formaldomedons seine größere Affinität bei der wässerigen Schicht. Beim Ansäuern der Nährlösung fällt das Formaldomedon nicht aus, trotzdem die schließlich isolierte Menge ein viel größeres Wasserquantum zur Lösung benötigen würde. Versuche, die in dieser Richtung angestellt wurden, zeigten, daß das Produkt lipoid gelöst bleibt. Während des Versuchs gehen infolge der steigenden alkalischen Reaktion (Bicarbonat — Carbonat) beträchtliche Mengen von Lipoiden usw. [nachweisbar nach *Hansteen*[1])] in Lösung. Aus dieser lipoidwässerigen Schicht geht die Ausschüttlung leichter vor sich als aus reinem Wasser. Da Petroläther und Wasser nicht mischbar sind, dient der petrolätherlösliche Lipoidanteil als

[1]) *B. Hansteen-Cranner*, Meldinger fra Norges Landbrukshoiskola **2**, H. 1/2. Kristiania 1922.

Vehikel für das Formaldomedon. Tatsächlich ergaben in dieser Richtung unternommene Versuche eine schnelle quantitative Ausschüttlungsmöglichkeit.

Nach Ablassen der wässerigen Schicht wird diese verworfen und der Petroläther zweimal mit konzentrierter wässeriger NaCl-Lösung, die noch überschüssiges festes NaCl enthält, gewaschen. Dies führt zur Beseitigung einer eventuell entstandenen schaumigen Zwischenschicht; es werden aber auch durch diese Behandlung aus dem klaren Petroläther in Lösung befindliche Stoffe abgeschieden. Es bildet sich eine ziemlich feste, schaumige Zwischenschicht, welche verworfen wird.

Der so gereinigte Petroläther wird zur vollständigen Beseitigung der wässerigen Anteile in einem Becherglas mehrere Stunden stehengelassen, dann vorsichtig in einen trockenen Rundkolben dekantiert

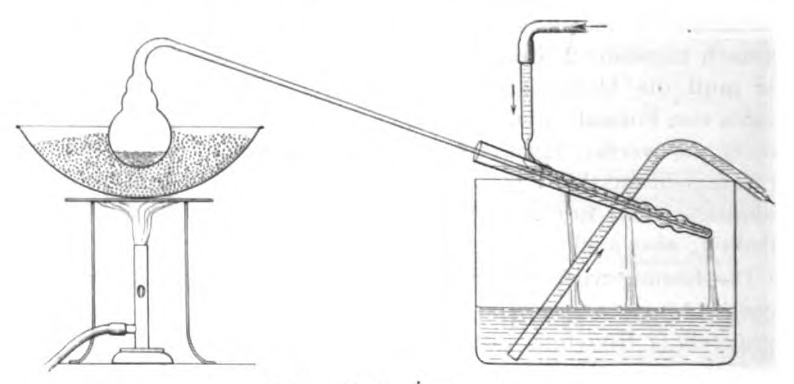


Abb. 3. Destillationsapparatur.

und im Vakuum abgedampft. Die Temperatur des Petroläthers oder seines Rückstandes soll nicht über 40° C steigen, der gelbe Rückstand, welcher zum großen Teil aus Dimedonkristallen besteht und das Formaldomedon enthält, wird bei 40° C mit 3 ccm 10proz. K_2CO_3-Lösung aufgenommen und diese mit konzentrierter H_3PO_4 schwach überneutralisiert.

Diese geringe Flüssigkeitsmenge, welche das gesamte Formaldomedon aus einem Versuch enthält, kommt nun zum Zwecke der Reindarstellung zur Mikrodestillation. Nach *Neuberg* geht Acetaldehyd schon beim Kochen mit Wasser aus der Dimedonbindung frei, Formaldehyd geht, wie wir uns überzeugten, erst bei höherer Temperatur aus kleinen Flüssigkeitsmengen über. Wir verwenden für die wenigen Kubikzentimeter Lösung Mikrodestillationskölbchen und Mikrovorlagen (Abb. 3), die jedesmal frisch geblasen werden. Das Kölbchen wird bei 200° C im Sandbad erhitzt, die Vorlage mit konzentrierter

Dimedonlösung beschickt und durch einen ständig überrieselnden Wasserstrahl gekühlt. Der Vorteil dieser Anordnung liegt vor anderen gebräuchlichen Mikrodestillationsmodellen in der Möglichkeit, einen leicht flüchtigen Stoff, wie Formaldehyd, durch Verbesserung der Kühlung und Anwendung des Prinzips einer Waschflasche leicht und vollständig an das vorgelegte Reagens binden zu können.

Während der Destillation schon tritt in der Vorlage eine Trübung (s. S. 365) ein, und bald beginnen die weißen Flocken des Formaldomedon auszufallen. Die mikroskopische Prüfung zeigt die für das erwartete Produkt charakteristischen langen, geraden Nadeln (Abb. 4a). Das Röhrchen wird 24 Stunden unter Zusatz von Kochsalz zum vollständigen Ausfallen des Niederschlages stehengelassen. Eine annähernd genaue, rasche Schätzung der ausgefallenen Mengen

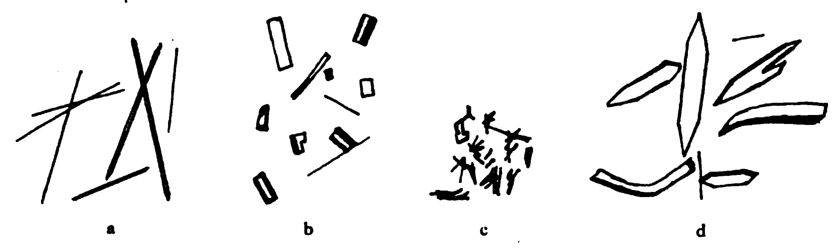


Abb. 4.
a) Formaldomedon, 60 mal vergrößert.
b) Formaldomedon bei 135 bis 140° umgelagert, 60 mal vergrößert.
c) Acetaldomedon, 60 mal vergrößert.
d) Anhydrid des Acetaldomedon, bei 140 bis 150° umgelagert, 60 mal vergrößert.

wurde durch Vergleich mit Destillaten eingewogener Mengen reinen Formaldomedons in steigender Reihe von 1 bis 15 mg in gleichen Vorlagen durchgeführt.

Das endgültige Kriterium zur Identifizierung des Formaldomedons bot uns die Mikroschmelzpunktsbestimmung, welche mittels eines eigens konstruierten Apparates durchgeführt wird (s. S. 379, Anm. 1).

Der Niederschlag enthält neben Formaldomedon aber auch geringe Mengen von bei der Atmung abgefangenen Acetaldehyd in Form von Acetaldomedon (Abb. 4c). Dieses würde den Schmelzpunkt herabdrücken und die Bestimmung unscharf machen. Wir können dieses Produkt auf zwei Arten eliminieren. Der erste Weg ist der, den Niederschlag unmittelbar nach der Destillation abzuzentrifugieren und zu waschen. Dabei muß man zwar auf den später noch fallenden Teil von Formaldomedon verzichten, hat aber das viel langsamer fallende

Acetaldomedon nicht mit im Niederschlag. Die zweite Möglichkeit beruht auf Trennung der beiden Aldomedone auf Grund der Sodaunlöslichkeit des Anhydrids vom Acetaldomedon. Die hierzu von *Volkholz*[1]) ausgearbeitete Makromethode wurde von uns für Mikrozwecke modifiziert. Der gesamte abzentrifugierte Niederschlag wird mit so viel 40proz. H_2SO_4 versetzt, daß er sich löst; bei den hier in Betracht kommenden Mengen sind das höchstens 4 ccm. Die Lösung wird 24 Stunden stehengelassen und dann mit Wasser auf 50 ccm verdünnt. Der nach mehreren Stunden ausgefallene Niederschlag wird abzentrifugiert, gewaschen und in einigen Kubikzentimetern 2proz. Sodalösung gelöst. Hierbei bleibt meist nur ein kleiner Teil, welcher sich bei der Schmelzpunktsbestimmung als Anhydrid des Acetaldomedons erweist, ungelöst, manchmal bleibt überhaupt kein ungelöster Rückstand, was durch die größere Wasserlöslichkeit des Anhydrids von Acetaldomedon in Verbindung mit der Kleinheit der durch nur achtstündige Atmungstätigkeit entstandenen Menge bedingt ist. Das Anhydrid wurde in diesem Falle also schon bei der vorhergehenden Operation beseitigt. Das Formaldomedon wird aus der Sodalösung durch Neutralisieren mit Salzsäure ausgefällt und dann zentrifugiert.

Bei der nun folgenden Mikroschmelzpunktsbestimmung ist es besonders wichtig, ein vollständig reines, staub- und faserfreies Präparat zu verwenden. Nun ist ein solches bei der Isolierung von sehr kleinen Mengen auf nassem Wege schwer zu erhalten. Deshalb benutzten wir zur weiteren Reinigung des Produktes seine Sublimationsfähigkeit in dem von uns eingeführten Apparat zur Sublimation unter vermindertem Drucke bei Kühlung der Vorlage[2]).

Das auf einem der beiden Wege erhaltene Produkt wird mit Hilfe einer Kapillare im Kupferschälchen des Apparates gesammelt und bei 40° C getrocknet. Die Steighöhe der Dämpfe soll 3 bis 4 mm betragen. Ansonsten erfolgt die Sublimation in der Weise, wie in der zitierten Arbeit beschrieben wurde. Die Sublimationstemperaturen für die in Betracht kommenden Körper sind: Dimedon 90 bis 100°, Acetaldomedon 110 bis 120°, Anhydrid desselben 130 bis 140°, Formaldomedon 120 bis 150° C. Es fällt also leicht, durch kurzes Erhitzen gegen 120° bei fraktionierter Sublimation unter ganz geringen Verlusten die letzten Spuren der zwei ersten Körper zu beseitigen. Die Anwesenheit dieser kommt aber nur bei dem auf die erste Art erhaltenen Produkt in Betracht. Das rein weiße Formaldomedonsublimat wird im evakuierten H_2SO_4-Exsikkator mindestens einen Tag lang getrocknet und dann

---

[1]) *Vorländer,* l. c. *Joh. Volksholz,* l. c.

[2]) *G. Klein* und *O. Werner,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **148**, 141, 1925.

zur Schmelzpunktsbestimmung gebracht. Diese wird nach den an reiner Substanz gewonnenen Erfahrungen durchgeführt[1]).

Das Deckglas mit dem Sublimat kommt mit der Substanz nach oben auf einen Objektträger zu liegen und wird mit einem zweiten Deckglas bedeckt. Hierauf wird das Präparat eingestellt und langsam angeheizt. Bis gegen 140° vollzieht sich eine vollständige Umlagerung des feinkristallinischen Sublimats in größere Kristalle, welche auf dem oberen Deckglas haften. Diese sind für Formaldomedon ganz charakteristisch und sind in Abb. 4b dargestellt. Es ist nun vorteilhaft, den Objektträger abzunehmen, auskühlen zu lassen und das Präparat nochmals zu trocknen, da sonst das Wasser, welches schwer abstreichen kann, die Schmelzpunktsbestimmung stört. Nach abermaligem Trocknen gibt die Substanz den scharfen Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt 187°.

Damit ist das Formaldomedon eindeutig als solches bestimmt. Es sei hier gleich betont, daß sich mit dem Apparat auch die Schmelzpunkte von Dimedon, Acetaldomedon und dem Anhydrid des letzteren eindeutig bestimmen lassen. Dieses zeigt Umlagerung in ganz andere Formen als das Formaldomedon (Abb. 4d) und den scharfen Schmelzpunkt 173°. Seine Bestimmung kommt beim Trennungsgang in Betracht. Die Identifizierung des Acetaldomedons ist besonders für die physiologischen Kontrollversuche wichtig, die weiter unten beschrieben werden. Dieses Produkt zeigt vor dem Schmelzen geringe Umlagerungstendenz und schmilzt bei 139°. Langsames Erhitzen ist besonders vor dem zu erwartenden Schmelzen in allen Fällen geboten. Die richtige Handhabung der Mikroschmelzpunktsbestimmung erfordert einige Erfahrung, wie ja auch die Makroschmelzpunktsbestimmung nie schablonenmäßig durchgeführt werden darf.

Die Aufarbeitung der Landpflanzen sowohl wie auch der abgepreßten Pflanzensubstanz der Wasserpflanzen führen wir folgendermaßen durch: Die Pflanzen werden mit 1 g Bleiacetat und 3 g Bariumhydroxyd verrieben, so daß die Reaktion des Gereibsels eine stark alkalische ist. Dann wird mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt und nach 24stündigem Stehen filtriert. Das gelbbraune Filtrat wird mit HCl angesäuert und mit dem entstandenen Niederschlag ausgeschüttelt. Der dabei entstehende voluminöse Schaum scheidet sich nach längerer Zeit erst, schneller bei Behandlung im Vakuum in einer Zwischenschicht ab. Oder wir versetzen den Bariumhydroxydextrakt mit dialysierter kolloidaler Eisenhydroxydlösung, lassen über Nacht stehen,

[1]) Der Schmelzpunktsbestimmungsapparat ist nach unseren Angaben in doppelter Ausführung bei den Optischen Werken Reichert (Wien) konstruiert und wird an anderem Ort ausführlich beschrieben.

filtrieren und schütteln die ganz klare, fast farblose Lösung nach Ansäuern aus. Die Weiterbehandlung des klaren Petroläthers, sowie Isolierung und Bestimmung des Produktes erfolgt wie im vorher angegebenen Gange.

Von den Kontrollversuchen ist die Nährlösung beim Dunkelversuch ebenso zusammengesetzt wie beim normalen Assimilationsversuch. Auch die Aufarbeitung ist genau dieselbe wie bei diesem. Es läßt sich nur Acetaldehyd nachweisen, und zwar in um so größerer Menge, je länger der Versuch läuft.

Die Anordnung beim CO_2-freien Versuch soll die Abb. 3 erläutern. Die Pflanzen befinden sich zuerst in ausgekochtem Leitungswasser und werden in diesem 6 Stunden unter Kalilaugenabschluß belichtet, um die noch vorhandene CO_2 durch Assimilation zu beseitigen. Hierauf wird so viel ausgekochte Dimedonlösung zur Nährlösung gelassen, daß ihre Konzentration 1 : 1000 wird, und 8 Stunden belichtet. Auch hier läßt sich in der Hauptsache nur Acetaldomedon isolieren, es treten aber auch kaum nachweisbare Spuren von Formaldomedon auf, deren Entstehung nur auf Kohlensäure aus der Dimedonlösung und besonders neu gebildete Atmungskohlensäure zurückgeführt werden kann.

Was die Aufstellung der Versuche mit Landpflanzen betrifft, so ist bloß die Wahl der Gefäße so zu treffen, daß die Assimilationsorgane möglichst vollständig dem Lichte exponiert werden können. Tropaeolumblätter werden zu drei bis vier in kleine Gläschen gestellt und serienweise belichtet, soviel eben ohne gegenseitige Beschattung unter der Kühlvorrichtung Platz haben. Zea Mais-blätter stellten wir im Kreise in einem höheren zylindrischen Gefäß auf. Equisetumsprosse wurden in dichter, einfacher Reihe in einer Küvette angeordnet. Die Belichtungsdauer bei diesen Objekten ist mit 8 bis 12 Stunden zu wählen.

Sempervivum- und Echeveriablätter werden an der Pflanze injiziert und diese mit dem Blumentopf unter die Kühlvorrichtung gestellt. Die Belichtungszeit kann man hier bis auf 48 Stunden ausdehnen.

Wurde Sulfit als Abfangmittel verwendet, dann wurde bei Wasserpflanzen die angesäuerte Nährlösung, bei Landpflanzen das feinzerhackte Pflanzenmaterial, mit angesäuertem Wasser versetzt, der Makrodestillation unterworfen. Zu beachten ist, daß mindestens eine Stunde unter Einschaltung eines kurzen Aufsatzrohres (verlängerte Steighöhe der Dämpfe etwa 1 dm) destilliert wird. Die lange Destillationsdauer wird durch die schwere Formaldomedonabspaltung in größeren Wassermengen bedingt, die Zwischenschaltung eines Aufsatzrohres ist zur möglichsten Zurückhaltung des mitdestillierenden Wassers nötig.

Aufgefangen wird in Dimedon. Auf gute Kühlung ist unbedingt Wert zu legen. Am besten ist die Verwendung eines „Energiekühlers". Das Destillat wird in gewohnter Weise sauer ausgeschüttelt und weiterbehandelt.

Bei den Versuchen mit Zuckerfütterung wurde die Glucose entweder gleichzeitig mit Dimedon etwa eine Viertelstunde vor Versuchsbeginn zugegeben oder 1 bis 2 Stunden vor dem Dimedonzusatz und der Belichtung.

Im ersten Falle werden die erhaltenen Formaldomedonmengen größer als im zweiten.

Bei den Narkoseversuchen wurde Phenylurethan gewöhnlich 1 Stunde vor Versuchsbeginn, HCN (berechnete optimale Menge nach *Warburg* für $p_H = 9$) 10 Minuten vor Versuchsbeginn gleichzeitig mit dem Dimedon gegeben. Die hemmenden Sulfitmengen mußten erst erprobt werden und bewegen sich entsprechend der vorhergehenden Einwirkungsdauer zwischen 0,01 bis 0,0005 Proz.[1]).

Die Aufarbeitung dieser Versuche bedurfte nur beim Phenylurethan einiger Abänderungen. Dieses geht bei unserem Gange in den Petroläther mit und destilliert bei der Mikrodestillation zum großen Teil mit über in die Vorlage. Auf Grund seiner Wasserlösbarkeit läßt es sich aber wie das Dimedon zum größten Teil auswaschen. Den übrigbleibenden Rückstand sublimieren wir fraktioniert. Da der Schmelzpunkt des Phenylurethans bei 51° liegt, läßt es sich leicht durch längeres Halten bei 60° ganz entfernen. Dann fraktionieren wir zwischen 110 und 130° wie üblich.

Zusammenfassung.

Es wurde versucht, auf analytisch-physiologischem Wege Formaldehyd als Zwischenprodukt bei der Kohlensäureassimilation der grünen Pflanze eindeutig zu charakterisieren.

Hierzu wurde unter Benutzung des *Neuberg*schen Abfangverfahrens eine Methode ausgearbeitet, Formaldehyd in der intakten Pflanze abzufangen und anzureichern, die geringen Mengen des erhaltenen Produktes rein kristallisiert darzustellen und eindeutig zu identifizieren.

Unter optimalen Versuchsbedingungen konnte bei voller Assimilation regelmäßig Formaldehyd gegriffen werden.

Die erhaltenen Mengen stellen unter den möglichen Bedingungen für diesen Prozeß gute Ausbeuten dar. Da der Nachweis von Form-

[1]) Nach Abschluß des Manuskripts fanden wir bei *Noack* (Zeitschr. f. Bot. 17, 481, 1925) fast identische Werte angegeben.

aldehyd im assimilierenden Blatte für die Zwischenproduktsnatur noch nicht beweisend ist, wurden erst alle Möglichkeiten einer Entstehung auf anderem Wege untersucht.

Verunreinigungen auf analytischem Wege waren ausgeschaltet.

Entstehung von Formaldehyd aus anderen Stoffen bei der Destillation wurde unmöglich gemacht.

Photolyse von Zuckern oder organischen Säuren in der Pflanze kommt nicht in Betracht. Versuche mit diesen Stoffen in vitro, in vivo, in farblosem und grünem Gereibsel und in der intakten assimilierenden Pflanze unter Ausschaltung des Assimilationsmechanismus waren einheitlich negativ. Auch eine photolytische Abspaltung von Formaldehyd aus Chlorophyll konnte unter den Assimilationsbedingungen nicht gefunden werden. Blattgereibsel und Chlorophyllextrakte ergaben nie auch nur Spuren von Formaldehyd.

Das physiologisch einengende Experiment erbrachte den vollen Beweis für den Zwischenstufencharakter des Formaldehyds bei der Assimilation.

Nur bei voller, normaler Assimilation treten greifbare Mengen von Formaldehyd auf. Im Dunkelversuch tritt nur Acetaldehyd als Atmungsprodukt auf.

Im „kohlensäurefreien“ Versuch wird fast nur Acetaldehyd neben geringen Mengen von Formaldehyd (aus der Atmungskohlensäure) gefunden.

Chlorophyllfreies Gewebe verschiedenster Herkunft gibt unter Assimilationsbedingungen nie Formaldehyd.

Bei schwacher oder irgendwie geschwächter Assimilation ist Formaldehyd nicht greifbar. Bei gleichzeitiger Glucosefütterung tritt neben gesteigerter Bildung von Atmungsaldehyd auch reichlicher (etwa um ein Drittel mehr) Formaldehyd auf, was aus einem langsameren Verlauf der Assimilationskette und größerer Abfangmöglichkeit erklärt wird.

Bei größeren Dimedonmengen tritt volle Narkosewirkung ein: dementsprechend ist nur Acetaldehyd, nicht Formaldehyd greifbar.

Narkose mit Phenylurethan hemmt die Formaldehydbildung völlig, der Atmungsaldehyd ist greifbar. Bei Blausäurewirkung tritt keine Spur von Formaldehyd, wohl aber Acetaldehyd auf.

Schweflige Säure hemmt Assimilation und Atmung vollständig, ein Zwischenprodukt konnte nicht gegriffen werden.

Das Ausbleiben der Formaldehydbildung bei Sistierung des Assimilationsmechanismus unter vollen Assimilationsbedingungen beweist die Rolle des Formaldehyds als Zwischenstufe bei der Assimilation.

Versuchstabellen.

Im folgenden seien aus den Versuchsprotokollen einige Auszüge wiedergegeben. Verwendet wurden immer 10 bis 15 g Pflanzen (Frischgewicht). Wasserpflanzen wurden zwischen Filterpapier lose abgepreßt und gewogen.

Die Untersuchungen wurden zu allen Jahreszeiten mit annähernd gleichen Ergebnissen durchgeführt. Vom Oktober bis April wurden die Pflanzen vor dem Versuche mindestens einige Tage bei 18 bis 22° und künstlichem Licht (50000 Lux), bei Wasserpflanzen mit mehrmaliger CO_2-Gabe täglich, auf möglichst optimale Assimilation gebracht. Alle übrigen Daten sind bereits oben (S. 372 bis 381) wiedergegeben.

Tabelle I.

12. IX. 24. Pflanzen 3 Stunden nach Versuchsabbruch aus der Lösung nach Abpressen entfernt, Lösung aufgearbeitet.

Pflanzenmaterial	Menge g	Belichtungsdauer Stdn.	Belichtungsstärke Lux	Temperatur °C	Menge des erhaltenen Produktes mg	Schmelzpunkt °C	Sonstiges
Elodea canadensis (aus den Teichen im Schwarzenbergpark bei Wien)	10	6	70 000	20	etwa 9	187	
dasselbe	10	6	dunkel	20	„ 8	139	
dasselbe	10	6	70 000	20	„ 4	140 Einige, etwa 20 Kriställchen (Vergrößerung im Mikroskop 130fach) schmelzen bei 185°	ohne CO_2
Elodea densa (aus dem Lunzer Untersee)	10	6	70 000	20	„ 8	187—188	
dasselbe	10	6	dunkel	20	„ 4	138—140	
dasselbe	10	6	70 000	20	„ 4	140° (etwa 30 Kriställchen 187°)	ohne CO_2

Tabelle II.

11. und 12. VI. 1925, an der biologischen Station in Lunz. (In je 2 Litern Seewasser.)

Pflanzenmaterial	Menge g	Belichtungsdauer Stdn.	Belichtungsstärke Lux	Temperatur °C	Abfangmittel	Menge des erhaltenen Produktes mg	Schmelzpunkt °C	Sonstiges
Elodea densa . .	15	12	40 000	20	1 prom. Dimedon	15	185 ohne vorheriges Umsublimieren	2mal auf 10° Calciumbicarbonat aufgefüllt
Elodea densa . .	10	12	40 000	20	1 " "	12	187° etwas Acetaldomedon	auf dem Anhydridwege dargestellt
Elodea densa . .	12	12	dunkel	19	1 " "	10	138°	gewaschenes und aufgetrocknetes Destillat
Chara	15	12	40 000	22	1 " "	3	139 u. 186°	in demselben Präparate bestimmt
Elodea densa . .	15	12	40 000	20	2 proz. K_2SO_3	6	185°	
Potamogeton praelongus . .	15	12	40 000	20	1 prom. Dimedon	12 + 2	187 138	nach der Anhydridmethode
Myriophyllum proserpinacoides (Landsprosse) .	20	12	40 000	20	5 " "	5	186 (wenig 140°)	Sprosse aufsaugen gelassen
Equisetum palustre (Landsprosse) . . .	20	12	40 000	20	5 " "	2	185	nur angetrocknetes Destillat
Equisetum palustre (Landsprosse)	20	12	40 000	20	1 proz. K_2SO_3	1	184	Destillat gerade noch greifbar

Tabelle III.

Vom 3. bis 10. VII. 1924.

Pflanzenmaterial	Menge g	Belichtungsdauer	Belichtungsstärke Lux	Temperatur	Abfangmittel Prom. Dimedon	Menge des erhaltenen Produktes mg	Schmelzpunkt °C	Sonstiges
Elodea canadensis . .	10	8h	50 000	18°	1	15	187	Nährlösung ohne Pflanzen sofort aufgearbeitet
dasselbe . .	10	8	dunkel	18	1	10	139	dasselbe
dasselbe . .	10	8	50 000	18	1	8	139 (Spur 189°)	dasselbe ohne CO_2
dasselbe . .	10	8	50 000	18	1	0	—	Gereibsel
dasselbe . .	10	8	50 000	18	1	0	—	Gereibsel + H_2O_2, 1 proz.
dasselbe . .	10	8	50 000	18	1	0	—	Gereibsel + H_2O_2, 0,1proz.
Beta vulgaris Rübe	30	8	50 000	18	1	0	—	grob zerkleinert
Impatiens parviflora (Stengelmark)	30	8	50 000	18	1	0	—	dasselbe
dasselbe . .	30	8	dunkel	18	1	0	—	dasselbe
dasselbe . .	30	8	„	18	1	0	—	+ 1 Proz. Glucose
dasselbe . .	30	8	50 000	18	1	0	—	+ 1 Proz. Bernsteinsäure + 1 Proz. Alanin
Elodea	20	8	50 000	18	1	3	139	Gereibsel
Triticum (ganze Pflänzchen) .	20	8	50 000	18	1	3	139	Gereibsel
Echeveria glauca	20	8	50 000	18	1	2	139	Gereibsel
Cryptomeria japonica (junge Sprosse) . . .	20	8	50 000	18	5	6	186	durch die Schnittflächen Dimedon aufsaugen gelassen
Hippuris vulg. (Luftsprosse)	20	8	50 000	18	2	2	187	dasselbe
Eupatorium sp.	20	8	50 000	18	2	2	187	dasselbe
Selaginella sp. .	20	8	50 000	18	2	2	187	dasselbe
Tropaeolum maius, Blätter	20	8	50 000	18	1	9	187	durch Blattstiele Dimedon aufsaugen gelassen
Zea mays . . .	20	8	50 000	18	5	3	187	dasselbe
Sempervoum tectorum . .	20	8	50 000	18	1	5	187	Dimedon + 0,1 proz. NaCl in Blätter injiziert
Elodea canadensis . .	20	8	10 000	18	1	—	—	kein Produkt greifbar
dasselbe . .	20	8	50 000	18	5	4	139	nur Atmung

Tabelle IV. 3. IV. 1925.

Pflanzenmaterial	Menge g	Belichtungsdauer Stdn.	Belichtungsstärke Lux	Temperatur °C	Abfangmittel Prom. Dimedon	Menge des erhaltenen Produktes mg	Schmelzpunkt °C	Sonstige Versuchsbedingungen
Elodea canadensis	10	5	80 000	20	1	etwa 4	187	Pflanzen etwas geschwächt
dasselbe . .	10	5	80 000	20	1	„ 10	etwa $^1/_3$ 138 „ $^2/_3$ 186	Zugabe von 1 Proz. Glucose zur Nährlösung
dasselbe . .	10	5	80 000	20	1	„ 6	„ $^1/_2$ 139 $^1/_2$ 187	Zugabe von 2 Proz. Glucose zur Nährlösung 1h 30′ vor Versuchsbeginn
dasselbe . .	10	5	dunkel	20	1	„ 4	139	dasselbe
dasselbe . .	10	5	80 000	20	1	„ 2	138	n/1000 HCN
dasselbe . .	10	5	80 000	20	1	„ 3	138, Spur 185	0,1 Proz. Phenylurethan
dasselbe . .	10	5	80 000	20	1	„ 6	138	n/1000 HCN + 1 Proz. Glucose
dasselbe . .	10	5	80 000	20	1	„ 3	140	0,05 Proz. Phenylurethan + 2 Proz. Glucose
dasselbe . .	10	5	80 000	20	1	„ 1	137	0,05 Proz. Phenylurethan + 0,1 Proz. Ammonoxalat + 0,1 Proz. Ammonmalat + 0,1 Proz. Ammontartrat
dasselbe . .	10	5	80 000	20	1	0	—	+ 0,0005 Proz. $NaHSO_3$ (26h vor Versuchsbeginn im Dunkeln zugefügt)
dasselbe . .	10	5	80 000	20	1	0	—	— 0,01 Proz. $NaHSO_3$ (2h vor Versuchsbeginn im Dunkeln zugefügt)

Tabelle V. Pflanzenstoffe unter Zusatz eines Katalysators belichtet.

1 Proz.	Glucose	+ 0,1 Proz.	$FeSO_4$	+ 0,5 Proz.	Dimedon	12h	nach	Destillation	0
1 „	Fructose	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0
1 „	Galactose	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0
1 „	Rhamnose	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0
1 „	Oxalsäure	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0
1 „	Bernsteinsäure	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0
1 „	Fumarsäure	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0
1 „	Milchsäure	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0
1 „	Apfelsäure	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0
1 „	Glykokoll	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0
1 „	Asparaginsäure	+ 0,1 „	$FeSO_4$	+ 0,5 „	„	12	„	„	0

Über den Einfluß von Formaldehyd auf die Alkaloidsynthese von Lupinus luteus L.

Von

Th. Sabalitschka und **C. Jungermann.**

(Eingegangen am 2. Dezember 1925.)

Um zur Aufklärung des Auf- und Abbaues der Alkaloide in den Pflanzen beizutragen, studierten wir die Veränderung des absoluten und prozentualen Alkaloidgehalts der einzelnen Teile der Lupine[1]) während der ganzen Vegetation und der Strychnospflanze während der ersten sieben Monate[2]); ferner prüften wir den Einfluß des Lichtes auf den Alkaloidgehalt der Lupine[3]) und die Möglichkeit der Diffusion von Alkaloid aus alkaloidhaltigen Samen in das Keimbeet während der Keimung[4]); schon früher hatten *Th. Sabalitschka* und *M. W. Zaher*[5]) die Einwirkung des arteigenen Alkaloids auf die keimenden Samen von Alkaloidpflanzen untersucht. In Fortsetzung unserer Versuche prüften wir auch den Einfluß des Formaldehyds auf die Alkaloidproduktion der Lupine, da der Formaldehyd wiederholt als ein Baustoff der Alkaloide angesprochen wurde.

Die Bedeutung des Formaldehyds für die pflanzliche Alkaloidsynthese betonte besonders *A. Pictet*[6]). Nach diesem Forscher besteht kein Grund zu der Annahme, daß sich der als Zwischenprodukt bei der pflanzlichen Kohlenstoffassimilation auftretende Formaldehyd ausschließlich mit sich selbst zu kondensieren vermag; seine große Reaktionsfähigkeit berechtigt im Gegenteil zu der Vermutung, daß er auf alle neben ihm in den Pflanzengeweben vorhandenen und ebenfalls reaktionsfähigen Verbindungen mit großer Begierde einwirken und mit ihnen unter Wasserabspaltung mannigfaltige Kondensationsprodukte liefern wird.

---

1) *Th. Sabalitschka* und *C. Jungermann*, diese Zeitschr. **163**, 445, 1925.
2) *Dieselben*, ebendaselbst **167**, 479, 1926.
3) *Dieselben*, ebendaselbst **164**, 279, 1925.
4) *Dieselben*, Pharm. Zentralh. **66**, 474 und 501, 1925.
5) Pharm. Monatsh. **4**, 172, 1923.
6) Arch. d. Pharm. **244**, 389, 1906. *A. Pictet* in Fr. Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie **1**, 236, „Entstehung der Alkaloide in den Pflanzen“. Berlin 1915.

Sind o-dihydroxylierte Verbindungen zugegen, so erfolgt eine Reaktion nach der Gleichung

$$R\langle{}^{OH}_{OH} + {}^{OH}_{OH}\rangle CH_2 = R\langle{}^{O}_{O}\rangle CH_2 + 2\,H_2O$$

unter Bildung der Methylendioxygruppe, die im Molekül nicht nur der Alkaloide, sondern vieler anderer Pflanzenstoffe so häufig vorkommt.

In Gegenwart monohydroxylierter Verbindungen sowie primärer oder sekundärer Basen oder ihrer Salze findet ebenfalls Kondensation statt; diese führt aber, unter gleichzeitiger Entbindung von Sauerstoff oder Kohlendioxyd, zur Bildung von Methylderivaten:

$$R - OH + CH_2O = R - OCH_3 + O,$$

wobei *A. Pictet* eine Erleichterung der Sauerstoffabspaltung durch pflanzliche Reduktasen vermutet, oder

$$R - NH_2 + CH(OH)_2 = R - NH - CH_2OH + H_2O,$$
$$3\,R - NH - CH_2OH = 2\,R - NH - CH_3 + R - NH - COOH + H_2O,$$
$$R - NH - COOH = R - NH_2 + CO_2.$$

Derartige Methylierungen wurden ja wiederholt ausgeführt.

A. Pictet sieht aber in dem Formaldehyd nicht nur das methylierend wirkende Agens in den Pflanzen und erklärt so das ausschließliche Vorkommen des Methylradikals in den Alkaloiden, sondern nimmt auch an, daß der Formaldehyd das erforderliche Kohlenstoffatom liefert, um Pyrrolderivate in Pyridinderivate umzuwandeln. Diese Anschauung der Alkaloidbildung durch Kondensationsreaktionen oder Kernsynthesen des Formaldehyds direkt oder weiter auch des durch Umwandlung des Formaldehyds im Sinne der *Cannizzaro*schen Reaktion entstandenen Methylalkohols fand die volle oder teilweise Zustimmung anderer, so von *Winterstein* und *Trier*[1]) und von *R. Wolffenstein*[2]). Auch *J. Gadamer*[3]) hält einen Zweifel daran, daß bei der Alkaloidsynthese Methylierung durch Methylalkohol oder Formaldehyd stattfindet, nicht möglich. Es gehen aber die Ansichten von *A. Pictet* und *J. Gadamer* über die physiologische Bedeutung der Alkaloidsynthese durch Formaldehyd auseinander; während *Pictet* darin eine absichtliche Entgiftungsmaßnahme der Pflanzen von schädlichen Endprodukten des eigenen Stoffwechsels sieht, ist *J. Gadamer*[4]) der Ansicht, daß die Methylierung keineswegs zu diesem Zwecke von den Pflanzen bewirkt wird, sondern im Gegenteil sich zum ökonomischen Nachteil der Pflanze einfach deshalb vollzieht, weil miteinander zur Reaktion befähigte Körperklassen zufällig gleichzeitig vorhanden sind. Demnach sind die Alkaloide nach *J. Gadamer* gewissermaßen Verlegenheitsprodukte des Aufbaues und nicht Entgiftungsprodukte des Abbaues, wie *Pictet* annahm.

Es war *O. Baudisch* und *E. Mayer*[5]) experimentell gelungen, außerhalb des Pflanzenkörpers durch Belichtung einer Lösung von Kaliumnitrit und

---

[1]) *Winterstein* und *Trier*, Die Alkaloide. Berlin 1910.

[2]) *R. Wolffenstein*, Pflanzenalkaloide, S. 7. Berlin 1922.

[3]) Ber. d. deutsch. pharm. Ges. 24, 42, 1914.

[4]) *J. Gadamer*, „Die Alkaloide" in H. Thoms, Handb. d. prakt. u. wissensch. Pharm. 2, 737, Berlin 1925.

[5]) Ber. 46, 115, 1913.

Formaldehyd über die Zwischenprodukte Formhydroxamsäure und Methylamin eine alkaloidähnliche Substanz zu gewinnen, die wahrscheinlich, wenn auch nicht sicher, den Pyridinring, doch jedenfalls den Pyrrol- bzw. Pyrrolidinring enthielt. Diese Substanz, eine ölartige, nach Nicotin riechende Flüssigkeit, wirkte beim physiologischen Versuch am Frosch wie Nicotin, ohne daß die Forscher sie tatsächlich als Nicotin ansprechen wollen.

Nach alledem lag die Möglichkeit eines Einflusses des Formaldehyds auf die Alkaloidsynthese nahe; ferner war es dem einen von uns [*Th. Sabalitschka*[1])] zum Teil gemeinsam mit *Riesenberg* und *Weidling* gelungen, bei künstlicher Formaldehydzufuhr eine Verwertung desselben zur Synthese höherer Kohlenhydrate durch die Pflanze festzustellen; daher erschienen auch Versuche über die Beziehung des Formaldehyds zur Alkaloidsynthese angezeigt. Wir behandelten Keimlinge und junge Pflanzen der Lupine mit einer Formaldehydatmosphäre und prüften, ob dadurch eine Veränderung des Alkaloidgehalts gegenüber gleichaltrigen, normalen Keimlingen oder Pflänzchen bewirkt wird.

Lupinensamen wurden im Hellen und Dunkeln in einer Formaldehydatmosphäre zum Keimen gebracht und 14 Tage nach der Aussaat die Pflanzen und ihre Teile auf ihren Alkaloidgehalt geprüft. In der Tabelle I sind die dabei gefundenen Alkaloidgehalte jenen, welche bei gleichaltrigen, unter normalen Verhältnissen im Licht gekeimten Pflänzchen erhalten waren, gegenübergestellt; über die Untersuchung der normalen Keimlinge ist hier schon berichtet[2]).

Tabelle I.

Pflanzenteil	Keimung im Hellen ohne Formaldehyd	Keimung im Hellen mit Formaldehyd	Keimung im Dunkeln mit Formaldehyd
Berechnet auf 100 Pflanzen wurden Gramm Alkaloid gefunden:			
Sproß	0,0109	0,0091	—
Hypokotyl. . . .	0,0219	0,0206	0,0172
Keimblätter . . .	0,0430	0,0314	0,0400 (+ Sproß)
Wurzel	0,0104	0,0074	0,0071
Ganze Pflanzen .	0,0862	0,0682	0,0643
Berechnet auf Trockengewicht der ganzen Pflanzen wurden Prozent Alkaloid gefunden:			
	0,60	0,54	1,02

[1]) Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 278, 1922; Zeitschr. f. angew. Chem. **35**, 684, 1922; Pharm. Monatsh. 4, 169, 1923; diese Zeitschr. **144**, 545, 1924; *Weidling*, Dissertation, Berlin 1925.

[2]) *Th Sabalitschka* und *C Jungermann*, diese Zeitschr. **163**, 451, 1925.

Die benutzten Lupinensamen enthielten ursprünglich in 100 Samen 0,1063 g Alkaloid oder 0,77 Proz. Wie bei den normalen Keimlingen trat auch hier eine Verminderung der absoluten Alkaloidmenge der ganzen Pflanze ein; während sie bei normalen Keimlingen ungefähr 20 Proz. betrug, entsprach sie hier ungefähr 40 Proz. des ursprünglich vorhandenen Alkaloids. Zwischen den im Hellen und Dunkeln gekeimten Pflänzchen ist kaum ein Unterschied in der Verminderung; auch enthalten bei beiden die Keimblätter und die über diesen stehenden Sprosse zusammen fast gleiche Alkaloidmengen, nämlich die Hellkeimlinge 0,0405 g, die Dunkelkeimlinge 0,0400 g; die Keimblätter und Sprosse der normalen Keimlinge enthielten dagegen 0,0539 g Alkaloid. Auch in dem absoluten Alkaloidgehalt der übrigen Teile bestanden zwischen den Hell- und Dunkelkeimlingen nur geringe Unterschiede.

Die Dunkelkeimlinge enthalten, berechnet auf Prozente des Trockengewichts, fast doppelt soviel Alkaloid als die Hellkeimlinge; dies findet eine Erklärung darin, daß die übrige Substanz der letzteren durch die Etiolierung auf die Hälfte reduziert ist; 100 Hellkeimlinge gaben 12,6 g Trockengewicht, 100 Dunkelkeimlinge nur 6,3 g, also gerade die Hälfte. Da aber in beiden Keimlingen ungefähr dieselbe absolute Alkaloidmenge vorhanden ist, muß der prozentuale Alkaloidgehalt der Dunkelkeimlinge das Doppelte des Gehalts der Hellkeimlinge ausmachen. Bei den mit Formaldehyd im Hellen behandelten Keimlingen blieb der prozentuale Alkaloidgehalt um ein Zehntel hinter dem Gehalt der normalen Keimlinge zurück; er betrug bei den normalen 0,060 Proz., hier 0,054 Proz., wobei noch zu berücksichtigen ist, daß auch das Trockengewicht hier geringer war als bei normalen Keimlingen; bei normalen gaben 100 Pflanzen 14,5 g Trockengewicht, bei den mit Formaldehyd im Hellen behandelten ergaben 100 Pflanzen 12,6 g Trockengewicht.

Wie der Formaldehyd die Trockensubstanz im Hellen herabsetzt und diese Herabsetzung im Dunkeln noch stärker war, so waren auch äußerlich Schädigungen der Keimlinge zu beobachten, und zwar wieder im Dunkeln stärker als im Hellen; besonders litt die Wurzel, deren Ausbildung bei den im Hellen mit Formaldehyd behandelten Pflanzen wenig, bei den im Dunkeln mit Formaldehyd behandelten Pflanzen erheblich hinter der Ausbildung der Wurzel normaler Keimlinge zurückblieb. Dies kommt deutlich bei einem Vergleich des absoluten und prozentualen Alkaloidgehalts der Wurzeln zum Ausdruck. 100 Wurzeln enthielten bei normalen Keimlingen 0,0104 g Alkaloid, bei im Licht mit Formaldehyd behandelten Keimlingen 0,0071 g Alkaloid und bei im Dunkeln mit Formaldehyd behandelten Keimlingen 0,0071 g Alkaloid; beide mit Formaldehyd behandelten Wurzeln enthalten

somit gleiche absolute Alkaloidmengen, aber rund 1/3 weniger als normale Wurzeln. Bei Berechnung des Alkaloidgehalts auf Prozente der Trockensubstanz erhalten wir 0,4, 0,32 und 1,2 Proz. Die Verminderung des prozentualen Alkaloidgehalts entspricht bei den im Licht mit Formaldehyd behandelten Pflanzen ungefähr der Verminderung ihres absoluten Gehalts; bei den im Dunkeln mit Formaldehyd behandelten Keimlingen steigt der prozentuale Gehalt aber infolge der schwächeren Entwicklung der Wurzel auf 1,2 Proz.; es bestehen hier gleiche Verhältnisse, wie oben in dem Verhalten des absoluten und prozentualen Alkaloidgehalts der einerseits im Hellen, andererseits im Dunkeln mit Formaldehyd behandelten ganzen Pflanzen.

Weiter setzten wir 3 Wochen alte Keimlinge der Lupine im Hellen der Formaldehydatmosphäre aus und ermittelten hierauf den Alkaloidgehalt der ganzen Pflanzen und ihrer Teile. In der Tabelle II sind die gefundenen Alkaloidgehalte den bei gleichaltrigen, normal gekeimten Pflanzen erhaltenen gegenübergestellt; über die Untersuchung der letzteren ist hier schon berichtet[1]).

Tabelle II.

Pflanzenteil	Absoluter Alkaloidgehalt in 100 Pflanzen		Prozentualer Alkaloidgehalt in der Trockensubstanz	
	ohne Formaldehydbehandlung g	mit Formaldehydbehandlung g	ohne Formaldehydbehandlung Proz.	mit Formaldehydbehandlung Proz.
Blätter	0,0693	0,0830	1,57	1,48
Stengel	0,0457	0,0425	1,02	1,04
Keimblätter . . .	0,0272	0,0245	0,93	0,81
Wurzel	0,0098	0,0035	0,29	0,14
Ganze Pflanzen . .	0,1520	0,1535	1,00	1,01

Sowohl der absolute wie der prozentuale Alkaloidgehalt der normalen und der mit Formaldehyd behandelten Pflanzen stimmt fast vollkommen überein, wenn auch in den Gehalten der einzelnen Teile geringe Unterschiede bestehen. Das Übereinstimmen des absoluten und prozentualen Alkaloidgehalts der ganzen Pflanzen ist deshalb möglich, da die jeweils von 100 Pflanzen erhaltene Gesamttrockensubstanz zufällig genau dieselbe war. Entgegengesetzt verhält sich der absolute und prozentuale Alkaloidgehalt der beiden Blätter; dies ist darauf zurückzuführen, daß die Blätter der mit Formaldehyd behandelten Pflanzen mehr Trockensubstanz lieferten als die normalen Pflanzen; die Blätter der ersteren gaben 5,6 g, die der letzteren nur 4,4 g

[1]) Diese Zeitschr. **163**, 452, 1925.

Trockensubstanz für 100 Pflanzen. Daher kann man wohl nicht auf eine Anreicherung des Alkaloidgehalts in den Blättern durch den Formaldehyd schließen; es ist ja auch der prozentuale Alkaloidgehalt der Blätter bei den mit Formaldehyd behandelten Pflanzen sogar niedriger. Deutlich weniger Alkaloid, sowohl absolut wie prozentual, enthielten die Wurzeln der mit Formaldehyd behandelten Pflanzen; die für Stengel und Keimblätter gefundenen Alkaloidmengen sind nicht wesentlich verschieden. Es hat den Anschein, als ob auch hier eine Schädigung der Wurzel durch den Formaldehyd eingetreten sei, da hier von 100 Pflanzen nur 2,5 g Wurzeltrockensubstanz erhalten wurde, während früher normale Pflanzen 3,4 g Wurzeltrockensubstanz gegeben hatten.

Die Formaldehydkonzentration der Atmosphäre entsprach dem Partialdruck einer 0,5proz. Formaldehydlösung; die aus einer solchen Lösung in die Luft übergehenden Formaldehydmengen sind sehr gering. da nach *F. Auerbach* und *H. Barschall*[1]) der mit einer Lösung von 8 g Formaldehyd in 100 ccm Wasser bei 18° gesättigte Dampf in 1 cbm nur 0,28 g Formaldehyd enthält, was einem Partialdruck einer solchen Lösung von 0,17 mm Hg entspricht. Immerhin war der Formaldehydgeruch der mit der 0,5proz. Lösung im Gleichgewicht stehenden Luft noch wahrnehmbar. Der eine von uns [*Th. Sabalitschka*[2])] benutzte bei seinen Versuchen über die Verwertung des Formaldehyds durch die Pflanze zur Synthese höherer Kohlenhydrate Formaldehydatmosphären, welche mit 2- bis 3proz. Formaldehydlösungen im Gleichgewicht standen; allerdings ließ er diese Formaldehydkonzentration kürzere Zeit auf die Pflanzen einwirken und unter Schutz der Wurzeln. So ist es wohl zu erklären — wenn man von der Möglichkeit der verschiedenen Widerstandsfähigkeit der Pflanzen ganz absehen will —, daß die seinerzeit beobachteten Schädigungen der Pflanzen durch den Formaldehyd geringer waren als die hier eingetretenen. Durch diese Schädigung dürfte aber die Prüfung der Frage, ob durch künstliche Zufuhr von Formaldehyd der Alkaloidgehalt der Lupine erhöht wird, nicht vereitelt werden; es sei nur daran erinnert, daß es ja damals dem einen von uns gelang, eine Verwertung des Formaldehyds durch die Pflanzen im Dunkeln zur Synthese höherer Kohlenhydrate nachzuweisen, obwohl auch da Schädigungen zu beobachten waren. Auch wenn die Lupine letzten Endes durch die längere Einwirkung der Formaldehydatmosphäre mehr oder weniger geschädigt wird, so müßte doch mindestens im Anfangsstadium der Einwirkung des Formaldehyds die Synthese

---

[1]) Arbeiten aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt 22, 628, 1905.

[2]) Ber. d. deutsch. pharm. Ges. 32, 278, 1922; diese Zeitschr. 144, 545, 1924.

der Lupinenalkaloide eine Steigerung erfahren, falls der Formaldehyd eine solche Steigerung überhaupt verursachen kann.

Weder bei keimenden Lupinen noch bei 3 Wochen alten Lupinenpflänzchen wurde durch dauernde Zufuhr geringer Mengen gasförmigen Formaldehyds die Alkaloidproduktion deutlich positiv beeinflußt. Die Behandlung mit Formaldehyd während des Keimens hatte sogar eine Verminderung des Alkaloidgehalts gegenüber normalen Pflanzen zur Folge. Diese Beobachtungen genügen aber wohl nicht zur Ablehnung der Hypothese von der Alkaloidsynthese durch Formaldehyd oder Methylalkohol. Es sei noch hingewiesen auf die von uns[1]) bei der keimenden Strychnospflanze festgestellte Vermehrung des absoluten und prozentualen Alkaloidgehalts, zu einer Zeit, zu welcher infolge Fehlens der grünen Blätter noch keine Kohlenstoffassimilation stattfinden, also noch kein Assimilationsformaldehyd in der Pflanze vorhanden sein konnte. Allerdings könnte man — um an der Hypothese der Alkaloidsynthese durch Formaldehyd festzuhalten — für diesen Fall auch annehmen, daß der zur Methylierung nötige Formaldehyd (bzw. Methylalkohol) den vorhandenen Kohlenhydraten entstamme; *J. Gadamer*[2]) weist darauf hin, daß selbst im tierischen Organismus, in dem von Assimilationsformaldehyd keine Rede sein kann, Methylierung mit Hilfe der Kohlenhydrate stattfindet: Betain und Pyridinmethylchlorid in der Garnele. Gegen die von *A. Pictet* in der Bildung der Alkaloide gesehene Entgiftung von schädlichen Abfallprodukten durch Methylierung sprechen auch die Beobachtungen von *G. Ciamician* und *C. Ravenna*[3]); diese Forscher stellten fest, daß die Methylamine gegenüber Pflanzen giftiger sind als Ammoniak, und zwar in zunehmendem Grade vom Monomethyl bis zum Trimethyl; analog verhielten sich Alkaloide und alkaloidähnliche Stoffe; es waren Coffein giftiger als Theobromin, Codein giftiger als Morphin, Chinin giftiger als Cinchonin, Cocain giftiger als Atropin, Methylharnsäure giftiger als Harnsäure, die Alkylderivate des Piperidins giftiger als Piperidin selbst usw.

Es sei bei diesen Versuchen nicht übersehen, daß gerade die Alkaloidsynthese der Lupine in erheblichem Maße von den der Pflanze gebotenen Bedingungen der Ernährung abhängt; dies wiesen doch *Vogel* und *E. Weber*[4]) bezüglich der Form des den Pflanzen zugeführten Stickstoffs nach. Führt man der Lupine Stickstoff ausschließlich als Ammoniak oder Nitrat zu, so ergeben sich stickstoffreiche, aber alkaloid-

---

[1]) Diese Zeitschr. **167**, 479, 1926.

[2]) *J. Gadamer* in H. Thoms Handb. d. prakt. u. wissensch. Pharm. **2**, 738, Berlin 1925.

[3]) Gazz. chim. ital. **49**, II, 83, 1919; Chem. Centralbl. **1920**, I, 340; Pharm. Monatsh. **3**, 99, 1922; Jahresb. d. Pharm. 58, 186, 1923.

[4]) Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Düngung, A. **1**, 85, 1922.

arme Pflanzen; steht der Lupine aber Stickstoff als Eiweiß ihres Knöllchenbakteriums Bacillus radicicola zur Verfügung, so reichert sich die Pflanze nicht nur mit Stickstoff, sondern auch mit Alkaloid an. *F. Merkenschlager*[1]) sieht in dem geringen Alkaloidgehalt der ausschließlich mit anorganischem Stickstoff ernährten Lupinen Hemmungen, welche die stickstoffhaltigen Salze veranlaßten. Es ist möglich, daß auf solche durch den Formaldehyd veranlaßte Hemmungen die von uns beobachtete Verminderung des Alkaloidgehalts durch Formaldehyd bei den Keimlingen gegenüber normalen Keimlingen zurückzuführen ist.

Versuch A.

Zu den Versuchen verwendeten wir dieselben Lupinensamen, Lupinus luteus L., welche wir auch für unsere schon mitgeteilten Versuche[2]) mit Lupine benutzt hatten; die Samen enthielten 0,1063 g Alkaloid in 100 Stück oder 0,77 Proz. und waren geliefert von der Firma *Metz & Co.*, Berlin-Steglitz.

Je 100 Samen gaben wir am 2. März 1924 in zwei Porzellanküvetten, die mit reinstem Seesand *Kahlbaum* 5 cm hoch beschickt waren; der Sand war mit destilliertem Wasser bis zur Krümelstruktur gleichmäßig benetzt. Während des Keimens der Samen wurde alle 2 Tage mit destilliertem Wasser gegossen, so daß der Wassergehalt des Sandes ungefähr derselbe blieb. Die beiden Küvetten stellten wir in zwei durch eine Wand vollkommen getrennte Räume eines Thermostaten; während der eine Raum durch eine Metalltür verschlossen war, war der andere mit einer Glastür versehen; es war somit möglich, unter sonst gleichen Bedingungen zwei Versuche auszuführen, von denen der eine aber im Dunkeln, der andere im Hellen ablief. Beide Räume maßen 30 cm in der Breite, 40 cm in der Höhe und 34 cm in der Tiefe. Außer den mit den Samen beschickten Küvetten brachten wir in die Räume unterhalb der Küvetten je eine flache Schale mit 200 ccm 0,5proz. Formaldehydlösung, die gemäß *Th. Sabalitschka*[3]) aus Paraform bereitet war. Die Keimung fand somit in einer Formaldehydatmosphäre statt.

Von den im Licht stehenden Samen waren am 10. März 38 Proz., am 12. März 74 Proz und am 17. März 84 Proz. gekeimt. Die Länge des oberirdischen Teiles betrug am 17. März meist 5 cm; die Keimblätter waren auffallend dunkelgrün, zwischen ihnen war bereits der junge Sproß entwickelt; im Vergleich zu normalen Keimlingen war eine Schädigung durch den Formaldehyd deutlich bemerkbar; die grünen Keimblätter waren ledrig, verschrumpft; die Hypokotyle waren teils völlig umgeknickt, teils geneigt.

Von den im Dunkeln sich befindenden Samen waren am 12. März erst 39 Proz., am 17. März erst 70 Proz. gekeimt, also weniger als im Tageslicht. Die Pflänzchen waren am 17. März sehr ungleich und schlechter entwickelt, als im Dunkeln ohne Formaldehyd zur Keimung gebrachte Pflänzchen. Das Hypokotyl war meist 5 bis 8 cm lang, die Keimblätter

---

[1]) Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Düngung, B. **2**, 533, 1923.

[2]) Diese Zeitschr. **163**, 450, 1925.

[3]) Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 289, 1922.

waren gelblich oder weiß; die zwischen ihnen stehenden jungen Sprosse hatten eine Länge von 1 bis 3 cm erreicht. Besonders wird durch Formaldehyd die Wurzel geschädigt; die beobachtete höchste Länge der Wurzel betrug 3 cm; bei gleichaltrigen im Dunkeln ohne Formaldehyd gekeimten Pflänzchen betrug die Länge 3 bis 6 cm, bei gleichaltrigen im Tageslicht gekeimten 5 bis 10 cm.

Am 17. März entnahmen wir von den im Hellen sich befindenden Keimlingen 70, von den im Dunkeln sich befindenden 64 zur Untersuchung; von den letzteren wurden die besonders stark zurückgebliebenen nicht mit verwendet. Die ersteren trennten wir in Sproß, Keimblätter, Hypokotyl, Wurzel und Samenschale, letztere in Sproß und Keimblätter, Hypokotyl und Wurzel; die Samenschalen wurden, soweit sie bereits abgefallen waren, gesammelt. Die Teile trockneten wir bei 70° im Lufttrockenschrank bis zum konstanten Gewicht und bestimmten ihren Alkaloidgehalt analog den früher hier schon berichteten Versuchen[1]), wobei wir die von uns unlängst angegebene Methode benutzten[2]).

Tabelle III und IV geben die erhaltenen Werte an; Tabelle III bezieht sich auf die im Hellen gekeimten Samen, Tabelle IV auf die im Dunkeln gekeimten.

Vegetationszeit 2. bis 17. März. Alter der untersuchten Pflanzen 14 Tage.

Tabelle III.

Pflanzenteil	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Gefundenes Alkaloid g	Alkaloidgehalt Proz.	Alkaloidgehalt in 100 Pflanzen g
Sproß	6,3141	0,5426	0,0064	1,18	0,0091
Hypokotyl	32,6262	1,6455	0,0144	0,88	0,0206
Keimblätter . . .	22,8778	2,9124	0,0220	0,76	0,0314
Wurzel	16,7982	1,5836	0,0050	0,32	0,0071
Samenschale . . .	4,2784	2,1662	0,0000	0,00	0,0000
Ganze Pflanzen .	82,8947	8,8503	0,0478	—	0,0682

Tabelle IV.

Pflanzenteil	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Gefundenes Alkaloid g	Alkaloidgehalt Proz.	Alkaloidgehalt in 100 Pflanzen g
Sproß und Keimblätter	18,7802	2,6464	0,0256	0,97	0,0400
Hypokotyl	14,5692	1,0000	0,0110	0,11	0,0172
Wurzel	6,0660	0,3820	0,0046	1,20	0,0071
Ganze Pflanzen .	39,4154	4,0284	0,0412	—	0,0643

Der Gesamtalkaloidgehalt von 100 Pflanzen ist bei den Hellkeimern und den Dunkelkeimern nicht erheblich verschieden; bei den

[1]) Diese Zeitschr. **163**, 451, 1925.

[2]) *Th. Sabalitschka* und *C. Jungermann*, Pharm. Zentralh. **66**, 145, 1925.

letzteren ist er noch etwas geringer; in beiden Fällen ist er wesentlich geringer als die ursprünglich in den Samen vorhandene Alkaloidmenge von 0,1063 g.

Versuch B.

Am 18. März 1924 säten wir die Lupinensamen in mit Gartenerde beschickte Töpfe und ließen diese bis zum 9. April im Warmhaus bei etwa 28° stehen; inzwischen waren die Samen gekeimt und hatten die Pflänzchen bereits Laubblätter gebildet. Am 9. April wurden vier Töpfe mit je zehn Pflanzen in den Thermostaten gebracht und dort im Hellen in gleicher Weise wie die Pflanzen bei Versuch A einer Formaldehydatmosphäre ausgesetzt; in dieser blieben sie bis zum 16. April. Während dieser Zeit begossen wir sie täglich mit Leitungswasser; nach 3 Tagen erneuerten wir die Formaldehydlösung. Am dritten Tage zeigte sich schon die schädliche Wirkung des Formaldehyds, nach 6 Tagen waren alle Pflanzen stark geschädigt, die Stengel waren geknickt, die Blätter fahl, fleckig, zusammengeschrumpft. Am 16. April entnahmen wir die 40 Pflanzen zur Untersuchung. Sie wurden getrennt in Laubblätter, Stengel, Keimblätter und Wurzel. Tabelle V gibt die erhaltenen Zahlen an.

Vegetationszeit 18. März bis 16. April 1924. Alter der Pflanzen 28 Tage.

Tabelle V.

Pflanzenteil	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Gefundenes Alkaloid g	Alkaloidgehalt Proz.	Alkaloidgehalt in 100 Pflanzen g
Blätter	5,4628	2,2358	0,0332	1,48	0,0830
Stengel	17,9178	1,6358	0,0170	1,04	0,0425
Keimblätter . . .	9,0808	1,2122	0,0098	0,81	0,0245
Wurzel	11,2103	1,0037	0,0014	0,14	0,0035
Ganze Pflanzen .	43,6722	6,0875	0,0614	—	0,1535

In Tabelle VI ist der bei diesen Versuchen gefundene absolute und prozentuale Alkaloidgehalt der ganzen Pflanzen angegeben; der für die einzelnen Teile der Pflanze erhaltene absolute Alkaloidgehalt ist in Tabelle VII, der prozentuale in Tabelle VIII zusammengestellt.

Tabelle VI.

Alter der Pflanzen Tage	Anzahl der Pflanzen	Trockengewicht g	Gefundenes Alkaloid g	Berechnet auf 100 Pflanzen		Alkaloidgehalt Proz.
				Trockengewicht g	Alkaloidgehalt g	
14 (hell)	70	8,8503	0,0478	12,64	0,0682	0,54
14 (dunkel)	64	4,0284	0,0412	6,29	0,0643	1,02
28	40	6,0875	0,0614	15,22	0,1535	1,01

Tabelle VII.

Alkaloidgehalt der einzelnen Pflanzenteile, berechnet auf 100 Pflanzen.

Alter der Pflanzen Tage	Sproß oder Laubblätter g	Hypokotyl oder Stengel g	Keimblätter g	Wurzel g
14 (hell)	0,0091	0,0206	0,0314	0,0074
14 (dunkel)	—	0,0172	0,0400 (+ Sproß)	0,0071
28	0,0830	0,0425	0,0245	0,0035

Tabelle VIII.

Alkaloidgehalt der einzelnen Pflanzenteile, berechnet in Prozenten auf Trockengewicht.

Alter der Pflanzen Tage	Sproß oder Laubblätter	Hypokotyl oder Stengel	Keimblätter	Wurzel
14 (hell)	1,18	0,88	0,76	0,32
14 (dunkel)	—	0,11	0,97 (+ Sproß)	1,20
28	1,48	1,04	0,81	0,14

Der Kohlehydratstoffwechsel der Maus nach Injektion von Zuckerlösungen und von Insulin. III.

Von

E. Bissinger und **E. J. Lesser.**

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1925.)

Vorbemerkung.

Wir haben vor 2 Jahren eine vorläufige Mitteilung[1]) über Versuche gemacht, bei denen ganze Mäuse auf reduzierende Substanz und Glykogen analysiert wurden, um auf diesem Wege Aufklärung über die Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels durch das Insulin zu erhalten. Die damals erhaltenen, vorläufigen Resultate wurden zunächst durch Respirationsversuche überprüft[2]). Aus diesen ergab sich die Fragestellung für die vorliegende Arbeit, welche lautet: Wie verhalten sich die Zuckermengen, welche auf Grund des Respirationsversuches als verbrannt berechnet werden, zu den Zuckermengen, welche laut chemischer Analyse des ganzen Tierkörpers (durch Reduktionsmethoden) verschwinden? Wir wünschten anfänglich mit beiden Versuchsmethoden, der gasanalytischen und der Reduktionsanalyse, die Insulinwirkung über 3 Stunden hin zu verfolgen. Methodische Schwierigkeiten, die große Anzahl von Versuchstieren, die verwendet werden mußte, haben uns dann dazu geführt, unser Thema vorläufig zu begrenzen. Wir legen daher in dieser Arbeit nur die Resultate vor, welche in den ersten 30 und 40 Minuten nach der Injektion von Zuckerlösung, bei Gegenwart und Abwesenheit von Insulin, erhalten wurden.

Obwohl ein solcher Vergleich zwischen dem Gaswechsel und der durch chemische Analyse feststellbaren Änderung des Gesamtkohlehydrats bisher niemals angestellt worden ist, sind über die uns interessierende Frage bereits ganz bestimmte Behauptungen aufgestellt worden. *Eadie, Mac Leod* und *Noble*[3]) erklären auch neuerdings

[1]) *Bissinger, Lesser* und *Zipf*, Klin. Wochenschr. **2**, 2233, 1923.
[2]) *E. J. Lesser*, diese Zeitschr. **153**, 39, 1924.
[3]) *Eadie, Mac Leod* and *Noble*, Amer. Journ. of Phys. **72**, 614, 1925.

wieder, daß Änderung des respiratorischen Quotienten und der Oxydationsgeschwindigkeit unter Insulinwirkung „is insufficient to account for the sugar that disappears". Die Arbeit, auf Grund deren diese Behauptung aufgestellt wird[1]), enthält aber keinen Beweis hierfür, da in dieser Arbeit nur der Gaswechsel und die Änderung des Blutzuckers unter Insulinwirkung ermittelt wird. Es muß daher im Gegensatz zu der Meinung der Torontoer Forscher festgestellt werden, die Frage, ob der unter Insulinwirkung verschwindende Zucker verbrannt worden ist, *konnte bisher überhaupt nicht entschieden werden,* weil die Größe des Gesamtkohlehydratschwundes auf chemischem Wege niemals ermittelt worden ist. Aus dem Sinken des Blutzuckers, das meist allein bestimmt worden ist, kann die Größe des gesamten Kohlehydratschwundes natürlich nicht erschlossen werden. Diese Größe ist es aber, welche, so gut es die gegenwärtigen Methoden erlauben, quantitativ ermittelt werden muß. Erst wenn das gelungen ist, kann die Frage, wie dieser Wert zu dem gleichzeitig zu ermittelnden Gaswechsel in Beziehung gesetzt werden kann, entschieden werden.

I. Methodik.

Die chemischen Methoden, die wir zur Reinigung der Lösungen verwendeten, in denen die Zuckerbestimmung nach *Bertrand* angestellt werden sollte, sind erst im Laufe der Arbeit so weit verbessert worden, daß sie uns vollständig befriedigten. Dabei hat es sich gezeigt, daß der Einfluß der Tierzahl, aus der ein Mittelwert gezogen wurde, wie es bei solchen, mehr statistischen Arbeiten zu erwarten war, von mindestens der gleichen Bedeutung ist, wie die Genauigkeit der benutzten, chemisch-analytischen Methode.

Trotz des großen Materials, das der Kundige in dem Werke *Pflügers* über das Glykogen findet, glauben viele Forscher immer noch aus der Analyse von zwei oder drei Versuchs- und ebenso vielen Kontrolltieren bindende Schlüsse ziehen zu können. Mit wenigen Ausnahmen sind daher die bisher in der Literatur vorhandenen Angaben über das Verhalten des Glykogens unter Insulinwirkung unbrauchbar, weil entweder die Zahl der analysierten Tiere viel zu klein ist, oder man bei Auswahl und Vorbehandlung der Tiere viel zu sorglos vorgegangen ist. Da wir jetzt sicher wissen, daß das Insulin sowohl den Kohlehydratstoffwechsel der Leber[2]) als auch der Muskeln[3]) beeinflußt, können bindende Schlüsse über Beeinflussung der Glykogensynthese durch das Insulin aus der Analyse der Leber allein nicht gezogen werden,

[1]) Vgl. Ber. d. ges. Phys. **27**, 106, 1924.
[2]) *F. Bernhard*, diese Zeitschr. **157**, 396, 1925.
[3]) *Burn* und *Dale*, Journ. of Phys. **59**, 164, 1924.

wie dies *Mac Leod* noch für möglich hält. Es muß vielmehr auch das ganze Tier analysiert werden, wenn das ganze Tier der Insulinbeeinflussung unterworfen war. Das Kaninchen ist für solche Versuche sehr wenig geeignet. Es werden auch auf dem Kontinent nur wenige Forscher in der Lage sein, die großen Mengen gleichartiger Tiere zu beschaffen und zu halten, die für solche statistischen Versuche nötig sind. Wir verwenden daher als Versuchstier die weiße Maus und begannen mit den hier geschilderten Versuchen erst, als wir selbst eine so zahlreiche Zucht, die von drei Weibchen und zwei Männchen ausging, erhalten hatten, daß immer die genügende Anzahl Männchen in ausgewachsenem Zustand vorhanden war, die wir wöchentlich verbrauchen wollten. Daran liegt es zum großen Teile, daß wir erst nach 2 Jahren in der Lage sind, der vorläufigen Mitteilung die erste, endgültige folgen zu lassen.

Wir haben zu diesen Versuchen nur Männchen benutzt, da Weibchen wegen Trächtigkeit, Lactation, Brunst zu große Differenzen aufweisen können. Die Tiere, die in Heu gehalten wurden, bekamen sehr reichlich Brot und Milch. 8 bis 14 Tage vor dem eigentlichen Versuch kamen gleichaltrige und etwa gleich schwere Tiere zwischen 20 und 26 g Gewicht in Einzelbehälter und wurden von jetzt an zweimal täglich in genau gleicher Weise mit Brot und Milch gefüttert. 18 Stunden vor dem Versuch wurden die Tiere gewogen. Es wurde ihnen das Futter entzogen und sie kamen bei Zimmertemperatur einzeln in Gefäße mit Watte. Nach 17 Stunden wurden sie wieder gewogen. Die Gewichtsabnahme während des Hungers betrug 3,5 bis 4 g. Die Feststellung des Gewichts der Hungertiere geschah erst, nachdem soweit als möglich die Harnblase ausgedrückt war. Dabei wurde häufig auch Kot entleert, so daß es während des Versuchs nur selten zur Kotentleerung kam. Zu jedem Versuch wurden immer vier Tiere benutzt, deren Gewicht nahezu gleichzeitig festgestellt wurde. Zwei Tiere dienten als Kontrolltiere zur Ermittlung des Kohlehydratgehalts des unbeeinflußten Tieres, zwei Tiere als Injektionstiere. Die Differenz zwischen beiden im Glykogengehalt und Gehalt an direkt reduzierender Substanz wurde durch *Bissinger* vorgenommen (B-Serien), die der gesamten hydrolysierbaren Kohlehydrate durch *Lesser* (L-Serien) ermittelt.

Die Injektion der Zucker- und Insulinlösungen wurde in der früher bereits eingehend beschriebenen Weise vorgenommen. Der Zuckergehalt der injizierten Lösung wurde in den L-Serien außer durch Titration nach *Bertrand* immer auch durch Polarisation bestimmt. Die Zuckerlösung wurde dabei für die Titration mit derselben Spritze und in derselben Weise abgemessen, wie bei der Injektion der Tiere. Die Eichung der Spritze hatte einen Inhalt von 0,972 $\pm$ 0,0004 ccm ergeben. Die größte Differenz in fünf Bestimmungen betrug 0,0012 ccm. Dementsprechend stimmen die Mittelwerte aus einer größeren Anzahl von Polarisations- und Titrationswerten gut überein.

Die Differenzen der Einzelwerte betragen in zehn beliebig ausgewählten Versuchen einmal 2,9 Proz., zweimal 1,8 Proz., einmal 1,2 Proz. Sie liegen in den übrigen angeführten Fällen innerhalb der Ablesungsfehler bei der Polarisation. Der Berechnung wurde stets der Titrationswert zugrunde gelegt. Sofort nach der Injektion, deren Zeitpunkt genau festgestellt wurde,

	Polarisation Proz.	Titration Proz.
	4,29	4,31
	5,13	5,04
	5,04	5,00
	4,54	4,41
	4,86	4,89
	4,57	4,51
	4,87	4,88
	4,77	4,80
	4,85	4,91
	5,12	5,21
Mittelwert	4,804	4,796

kamen sowohl die Versuchs- als auch die Kontrolltiere in leere Bechergläser und verblieben darin für genau 30 oder 40 Minuten. Dann kamen sie, eventuell nach vorheriger Wägung, in feste Kohlensäure, wie dies früher bereits beschrieben ist. Die Gefäße, in denen die injizierten Tiere gesessen hatten, wurden sorgfältig mit destilliertem Wasser ausgespült und in jedem Versuch die Spülflüssigkeit quantitativ auf Zucker verarbeitet. In den meisten Fällen war in der Spülflüssigkeit kein Zucker nachweisbar. In etwa 10 Proz. der Versuche wurden geringe Mengen in der Spülflüssigkeit gefunden, die jedoch 1 mg nie überschritten. Sie wurden von der injizierten Traubenzuckermenge rechnerisch in Abzug gebracht. Wurde Insulin injiziert, so war dieses der Traubenzuckerlösung vorher in berechneter Menge zugesetzt worden. Benutzt wurde für alle Versuche das englische Insulin *Brand*. Die Verdünnung wurde hergestellt, indem von der Originallösung 0,15 ccm mit stets derselben Rekordspritze und derselben Kanüle abgemessen wurden. Diese wurden dann, unter Ausspülung der Spritze mit destilliertem Wasser, auf 12 ccm aufgefüllt; hiervon wurde die nötige Menge zu der Traubenzuckerlösung hinzugefügt, die dann erst auf das verlangte Volumen aufgefüllt wurde. Unsere Insulinfläschchen enthielten 5 ccm und pro Kubikzentimeter 20 klinische Einheiten. Es konnten demnach mit ein und demselben Röhrchen über 30 Versuche ausgeführt werden. Insulinverdünnung und Traubenzuckerlösung wurden in jedem Versuch unmittelbar vor der Injektion frisch hergestellt.

In der festen Kohlensäure blieben die Tiere etwa 35 Minuten lang. Dann wurden sie auf einem kleinen Holzbrett in der früher angegebenen Weise in Scheiben zerschnitten. Es gelang so, quantitativ den gesamten Mauskörper in gefrorenem, zerkleinertem Zustande zu erhalten. Die Verluste beim Zerschneiden betrugen maximal 1 Proz., meist weniger. Nach dem Zerschneiden wurde die zerkleinerte Masse in gewogene Gefäße gebracht und jedesmal ihr Gewicht festgestellt, obwohl sich fast nie erhebliche Differenzen gegenüber dem unzerschnittenen Tier herausstellten. Die Gefäße mit dem zerkleinerten Materiel blieben bis zur Weiterverarbeitung in fester Kohlensäure.

Die chemische Methode der Zucker- und Glykogenbestimmung in den B-Serien wurde folgendermaßen durchgeführt: Die gefrorene Masse wurde mit 100 ccm 96proz. Alkohol von — 20 bis 30° übergossen. Sie wurde in vier Portionen möglichst bald in der Reibschale unter 96proz. Alkohol gründlich verrieben, was etwa 1 Stunde in Anspruch

nimmt. Die vier verriebenen Portionen werden in ein Becherglas abgegossen und hier wieder vereinigt. Von dem sich rasch absetzenden Bodensatz wird abgegossen und der rückständige Gewebebrei wird sechsmal je 10 Minuten mit je 25 ccm 96proz. Alkohol in der Reibschale unter Bearbeitung mit dem Pistill extrahiert. Nach jeder Extraktion wird unter Ausdrücken des Rückstands mit dem Pistill in das Becherglas, das den ersten Extraktionsalkohol enthält, dekantiert. Im ganzen wird zur Extraktion etwa zehnmal soviel Alkohol in Kubikzentimetern verbraucht, als die Tiere Gramme wiegen. Der nach der letzten Alkoholextraktion in der Reibschale verbliebene Rückstand wird nach *Pflüger* auf Glykogen verarbeitet. Der Extraktionsalkohol wird klar zentrifugiert, das Sediment gründlich mit Alkohol gewaschen. Der Alkohol und sämtliche Waschflüssigkeiten werden im Wasserbad unter Wasserzusatz eingeengt und der Alkohol wird völlig vertrieben. Der Rückstand wird mit sämtlichen Niederschlägen in einen Meßkolben übergeführt, mit Quecksilberacetat versetzt und mit Wasser aufgefüllt. Alsdann wird filtriert, mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert und nach Vertreiben des Schwefelwasserstoffs durch einen Luftstrom im letzten Filtrat die Zuckerbestimmung nach *Bertrand* ausgeführt. Die Sedimente, welche bei der Zentrifugierung des Extraktionsalkohols erhalten worden waren, wurden in 60proz. Kalilauge gelöst und mit dem bei der Extraktion der Reibschale zurückgebliebenen, in 60proz. KOH gelösten Rückstand vereinigt und dann in den vereinigten Flüssigkeiten die Glykogenbestimmung nach *Pflüger* ausgeführt. So wurde in den meisten B-Serien verfahren. In der letzten wurde jedoch vor der Bestimmung der reduzierenden Substanz im Filtrat der Quecksilberfällung noch eine Fällung mit Phosphorwolframsäure vorgenommen. Dies geschah, weil die Zuckerbestimmung trotz der Reinigung mit Quecksilberacetat nicht immer glatt vor sich ging. Doppelbestimmungen zeigten nicht die tadellose Übereinstimmung der Permanganatwerte, die man in reinen Zuckerlösungen bei der Bertrandmethode stets erhält. Die zur Fällung benutzte Phosphorwolframsäuremenge betrug stets nur wenige Kubikzentimeter einer 5proz. Lösung. Die überschüssige Phosphorwolframsäure im Filtrat brauchte nicht entfernt zu werden. Wie wir uns an reinen Zuckerlösungen überzeugten, stört die Gegenwart kleiner Phosphorwolframsäuremengen die Zuckerbestimmung nach *Bertrand* nicht. Wir erhielten mit und ohne Gegenwart von Phosphorwolframsäure in reinen Zuckerlösungen genau gleiche Permanganatwerte. In allen Fällen haben wir aber die Eigenreduktion unserer Flüssigkeiten beim Bertrandverfahren bestimmt, die zwischen 2 und 2,5 mg Kupfer betrug. Dieser Wert wurde stets von den gefundenen Permanganatwerten abgezogen. Bei dem Auffüllen der zu analysierenden Zuckerlösung auf 50 ccm wurde der Niederschlag nicht berücksichtigt,

sondern einfach abfiltriert. Da stets auf das gleiche Volumen aufgefüllt wurde und das Tiergewicht nur wenig schwankte, war das Volumen des Niederschlags stets etwa das gleiche. Das Volumen des trockenen Quecksilberniederschlags wurde in den B-Serien jedesmal nachträglich ungefähr ermittelt. Es betrug im Mittel 2,5 ccm. Demnach war nicht auf 50 ccm, sondern nur auf 47,5 ccm aufgefüllt worden. Dieser Wert wurde der Rechnung zugrunde gelegt.

Bei der Ermittlung der gesamten, durch Hydrolyse erhaltbaren Kohlehydrate wurden verschiedene Methoden angewendet. Zuerst verfuhren wir im wesentlichen nach der von *Parnas* und *Wagner*[1]) angegebenen Methode. Das gefrorene und zerkleinerte Material wurde zuerst mit Alkohol, dann viermal mit kochendem Wasser extrahiert, nach Verdampfen des Alkohols wurden die beiden Extrakte miteinander vereinigt und durch dreistündiges Erhitzen in 3proz. Schwefelsäure im Wasserbade hydrolysiert. Die Schwefelsäure wurde mit Barytwasser quantitativ beseitigt, Filtrat und Waschwasser des Barytniederschlags auf passendes Volumen eingeengt, mit Quecksilberacetat gefällt und auf bestimmtes Volumen aufgefüllt. Entquecksilberung und Zuckerbestimmung dann in der gewöhnlichen Weise. Sämtliche bei der Alkohol- und Wasserextraktion zurückgebliebenen Rückstände wurden nach *Pflüger* auf Glykogen verarbeitet. Stets wurde, statt zu filtrieren, zentrifugiert.

Dieses etwas umständliche und lange dauernde Verfahren wurde verlassen, nachdem sich ergeben hatte, daß die Methode der totalen Hydrolyse der Tierkörper gleiche Resultate liefert. Diese Methode, welche früher zur Bestimmung der Gesamtkohlehydrate im Froschschenkel gedient hat[2]), ist kürzlich auch von *Meyerhof*[3]), *Janssen* und *Jost*[4]) und von *Ahlgren*[5]) benutzt worden. Wenn man diese Methode aber nach einem Autor bezeichnen will — seinerzeit wurde darauf verwiesen, daß *Lépine, Bierry* und *Gruzewska, Röhmann, Forschbach* und *Scheffer* vorher bereits ähnlich verfahren sind —, so muß sie als Methode von *O. Loewi* bezeichnet werden. Dieser hat sie in seiner Abhandlung „Zur Frage der Verwertbarkeit der Glucose bei Diabetes“[6]) bereits angegeben, was *Lesser* bei seiner damaligen Publikation unbekannt geblieben war. *Loewi* gibt auch bereits an, daß das Filtrat vom Quecksilberniederschlag der bei der Totalhydrolyse erhaltenen Lösung immer Biuretreaktion gibt, daß aber die Stoffe, welche diese

[1]) *Parnas* und *Wagner*, diese Zeitschr. **61**, 387, 1914.
[2]) *E. J. Lesser*, ebendaselbst **103**, 8, 1920.
[3]) *Meyerhof, Lohmann* und *Meier*, ebendaselbst **107**, 464, 1925.
[4]) *Janssen* und *Jost*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **148**, 47, 1925.
[5]) *Ahlgren*, Zur Kenntnis d. tier. Gewebsoxyd. Lund 1924, S. 178.
[6]) *O. Loewi* (Graz), Therapeut. Monatshefte **32**, 350, 1918.

Reaktion hervorrufen, die Zuckerbestimmung nach *Bertrand* nicht stören. Bei der Anwendung der Methode zur Analyse der Mauskörper wurde folgendermaßen verfahren: Die Tiere wurden wie gewöhnlich gefroren und geschnitten. Die Schnitte kamen in gewogene Erlenmeyerkolben, wurden rasch gewogen und bis zur Weiterverarbeitung in feste Kohlensäure gestellt. Sie wurden dann mit dem gleichen Volumen 6 proz. Schwefelsäure übergossen und umgeschwenkt, bis alle Schnittflächen mit der Schwefelsäure in Berührung waren. Dabei tauten die Schnitte noch nicht auf. Jetzt wurden die Analysen der Versuchs- und Kontrolltiere gleichzeitig in *dasselbe* Wasserbad (*Meyerhof*) versenkt und 3 Stunden darin belassen, unter Bedeckung der Erlenmeyerkolben. Der Inhalt der Erlenmeyerkolben wurde dann noch heiß in einen 400-ccm-Meßkolben überführt und nach Abkühlen bis zur Marke aufgefüllt. Dabei wurde das Gewebe mit unten verbreiterten Glasstäben möglichst zerkleinert. Die Flüssigkeit im Meßkolben blieb unter häufigem, starkem Schütteln einige Stunden stehen. Dann wurde durch Faltenfilter filtriert. 200 ccm Filtrat wurden in einen Meßkolben von 300 ccm gebracht und mit 33 proz. Natronlauge neutralisiert. Dann wurden 50 ccm 30 proz. Quecksilberacetatlösung hinzugesetzt und zur Marke aufgefüllt. Nach 12 stündigem Stehen wurde zentrifugiert und das Zentrifugat in gewöhnlicher Weise entquecksilbert. Vom letzten Filtrat wurden 200 ccm (nach Abstumpfen etwa der Hälfte der Essigsäure mit NaOH) im Wasserbad auf etwa 15 ccm eingeengt, in einen 100-ccm-Kolben überführt und mit absolutem Alkohol bis zur Marke aufgefüllt, um die anorganischen Salze auszufällen. 90 ccm des Filtrats wurden im Wasserbad eingeengt, bis der Alkohol vertrieben war. Im Rückstand wurde nach Neutralisation und Filtration die Zuckerbestimmung nach *Bertrand* ausgeführt. Sorgfältig wurde darauf geachtet, daß die Verarbeitung der Versuchs- und Kontrolltiere stets in genau der gleichen Weise geschah. Beide wurden immer auf gleiche Volumina aufgefüllt und gleiche Volumina der Filtrate wurden verarbeitet. Sie wurden gleichzeitig filtriert und befanden sich gleich lange auf dem Wasserbade. Das Einengen auf dem Wasserbade wurde stets in halbkugeligen Glasschalen vorgenommen und durch passende Wahl der Ringe des Wasserbades ein Überhitzen am Rande sicher verhütet. Ein Fehler, der sich bei den Versuchs- und Kontrolltieren geltend macht, aber in prozentual genau gleicher Weise auswirkt, entsteht dadurch, daß beim Auffüllen auf bestimmtes Volumen das Volumen der Niederschläge nicht berücksichtigt wird, was in den B-Serien stets geschehen war. Es werden daher, wie Schätzungen des Volumens dieser Niederschläge ergaben, um etwa 10 Proz. zu hohe Werte erhalten. Hierfür muß an dem endgültigen Werte eine Korrektur angebracht werden. Die soeben beschriebene Methode befriedigte anfänglich, dann aber

stellte sich heraus, daß das Kupfer des öfteren bei der Bertrandanalyse verspätet ausfiel und dann nicht die bekannte ziegelrote Farbe, sondern eine lehmgelbe hatte. Es wurden daher sämtliche Serien noch einmal wiederholt, wobei zunächst, so wie eben beschrieben, bei der Analyse verfahren wurde. Das letzte eingeengte, vom Alkohol befreite Filtrat wurde dann noch mit Phosphorwolframsäure vollkommen ausgefällt und die Bertrandanalyse im Filtrat von dieser Fällung ausgeführt, ohne die überschüssige Phosphorwolframsäure zu entfernen. Zur Ausfällung waren 5 bis 7 ccm einer 5 proz. Phosphorwolframsäurelösung in 2 proz. Salzsäure nötig. Nunmehr gelang es immer, die Bertrandanalyse ohne Schwierigkeit auszuführen. Doppelanalysen mit verschieden großen Filtratmengen gaben gut übereinstimmende Werte. So wurde z. B. gefunden: a) in 10 ccm Lösung sind enthalten bei Analyse von

10 ccm . . . . 4,0 mg Traubenzucker
20 „ . . . . 4,1 „ „
27 „ . . . . 4,0 „ „

b) in 10 ccm Lösung sind enthalten bei Analyse von

10 ccm . . . . 5,9 mg Traubenzucker
30 „ . . . . 5,9 „ „

Um bei den Ergebnissen beurteilen zu können, welche Methode verwendet wurde, bezeichnen wir diese kurz folgendermaßen: In den B-Serien 1. Alkoholmethode, 2. Alkohol-*P. W. S.*-Methode; in den L-Serien 1. Parnas- und Wagnermethode, 2. Totalhydrolyse, 3. Totalhydrolyse *P. W. S.*

II. Ergebnisse.

1. Der Gesamtkohlehydratgehalt in den B- und in den L-Serien.

Sämtliche gefundenen Werte sind in der Tabelle I zusammengestellt. In den B-Serien liegt der für die reduzierende Substanz gefundene Wert mit einer Ausnahme (August 1925) zwischen 80 und 90 mg pro 100 g Tier. Er schwankt hier nur um 10 Proz., während die Glykogenwerte stark schwanken und maximal um 100 Proz. voneinander abweichen. Der sehr niedere Wert für die reduzierende Substanz in der B-Serie V ist nicht durch die veränderte Methode bedingt. Auch der Glykogenwert dieser Serie ist abnorm niedrig und liegt erheblich tiefer als alle vorher gefundenen. Um zu entscheiden, ob es sich hierbei um Einflüsse der Jahreszeit handelt, reicht das Material nicht aus. Es wäre auch möglich, daß es sich um Veränderungen der Tiere bei lange dauernder Zucht gehandelt hat. Mit Ausnahme der Serie II (ungewöhnlich hoher Glykogenwert) liegen die Werte für Glykogen und für Traubenzucker recht nahe beieinander. Die größte Differenz beträgt 24 Proz., im Mittel aller Werte beträgt sie 14 Proz. des Wertes der

Tabelle I. Gesamtkohlehydratgehalt der Kontrolltiere.

Serie Nr.	Monat und Jahr	Pro 100 g Tier in mg			Glykogen in Proz. des Traubenzuckers	Zahl der Tiere, aus denen der Mittelwert gezogen	Bezeichnung der Serie	Methode
		Gesamtkohlehydrat	Traubenzucker	Glykogen				
1	August bis Oktober 1923 . .	160	88	72	82	5	B	Alkohol
2	März 1924 . . .	244	90	154	170	12	„	„
3	März bis April 1925	196	87	108	124	17	„	„
4	Mai bis Juni 1925	156	81	75	92	16	„	„
5	August 1925 . .	111	59	52	88	16	„	„ *P. W. S.*
	Mittelwert	171	80,5	91,8	114	66		
1	August bis Oktober 1924 . .	224	—	68	—	8	L	*Parnas* und *Wagner*
2	Februar bis März 1925	232	—	69	—	10	„	dieselben
3	April bis Mai 1925	223	—	—	—	6	„	Totalhydrolyse
4	Mai bis Juni 1925	229	—	—	—	16	„	„
5	August bis September 1925 .	232	—	—	—	16	„	„ *P. W. S.*
6	Juli und September 1925 .	238	—	—	—	16	„	„
7	Oktober 1925 . .	222	—	—	—	16	„	„
	Mittelwert	229	—	—	—	88		

reduzierenden Substanz. Die Summe beider Werte (von nun an stets als „Gesamtkohlehydrate“ bezeichnet) schwankt, hauptsächlich wegen des wechselnden Glykogengehalts, recht erheblich. Der maximale Wert beträgt mehr als das Doppelte des minimalen. Ganz anders sind die Verhältnisse in den L-Serien. Hier schwankt der Wert für die Gesamtkohlehydrate fast gar nicht. Die größte Differenz dieser (auf das Volumen der Niederschläge korrigierten) Werte beträgt nur 7 Proz. Das ist ein sehr merkwürdiges Verhalten; da in den ungefähr gleichzeitig angestellten B-Serien des Jahres 1925 der Glykogengehalt um 100 Proz. schwankt, scheint sich zu ergeben, daß hydrolysierbare Kohlehydrate vorhanden sind, deren Menge vom gleichzeitigen Glykogengehalt abhängt und umgekehrt zu diesem variiert. Es sei aber darauf hingewiesen, daß diese Verhältnisse nicht verallgemeinert werden dürfen. Sie gelten zunächst nur für den Spezialfall des Hungertieres, bei dem eine bestimmte Größe der Gluconeogenie vorhanden ist, die vielleicht beim gefütterten Tiere vollkommen fehlt. Es entsteht ferner die Frage, ob die bei der Totalhydrolyse gefundenen Werte auf Traubenzucker bezogen werden dürfen. Es könnten sich ja bei der Hydrolyse auch reduzierende Stoffe gebildet haben, welche keine Kohlehydrate sind. Wir haben daher nachgesehen, ob die gesamte reduzierende Substanz mit der *Salkowski-van Slyke*schen Methode[1]) der Kupfer-

[1]) Vgl. hierzu die folgende Mitteilung.

Tabelle II.

Totalhydrolyse* P. W. S. Analysator L mg	Im Hg-Filtrat Kupfer-Kalk-fällung Analysator B mg	Die Kupfer-Kalkfällung liefert weniger Proz.	Bemerkungen
122,6	100,8	18	Grundwerte aus den L-Serien V und VI nicht auf 100 g Tier umgerechnet
111,1	100,0	10	
101,3	73,2	28	
117,7	114,4	3	
113,2	97,2	14	
Mittelwert 113,2	97,1	14,2	

Kalkfällung fällbar ist und dabei die in Tabelle II zusammengestellten Werte erhalten. Dabei zeigt es sich, daß wechselnde Mengen (zwischen 3 und 28 Proz.) mit Kupfer und Kalk nicht fällbar, also keine Kohlehydrate waren. Im Mittel ergab sich bei der Kupfer-Kalkfällung eine Abnahme der reduzierenden Substanz um 14,2 Proz. Wenn für den aus 88 Tieren erhaltenen Mittelwert von 229 mg Gesamtkohlehydraten eine diesbezügliche Korrektur angebracht wird, so ergibt sich der Gesamtkohlehydratgehalt in den L-Serien zu 196 mg im Mittel. In den B-Serien beträgt der Mittelwert aus 66 Tieren 171 mg. Die Totalhydrolyse ergibt also im Mittel um etwa 15 Proz. höhere Werte. Wir haben gelegentlich nachgesehen, ob sich in den B-Serien die im alkoholischen, mit Quecksilberacetat gereinigten Extrakt befindliche reduzierende Substanz durch dreistündige Hydrolyse mit 2proz. Salzsäure vermehrt. Wir fanden eine Zunahme durch Hydrolyse um 10 Proz. Der Mittelwert der B-Serien würde sich bei Berücksichtigung dieser Zunahme durch Hydrolyse auf 180 mg erhöhen. Die Differenz gegenüber dem Mittelwert der L-Serien von 196 mg würde sich dann auf nur 8 Proz. erniedrigen. In den einzelnen Serien ist diese Differenz aber einmal sehr viel größer. Wenn die beiden L- und B-Serien V verglichen werden, ergibt sich für die L-Serien ein korrigierter Wert von 199 mg, für die B-Serie von 111 mg. Die Differenz beträgt fast 80 Proz.! Wie dieser sehr niedrige Wert der B-Serie V zu erklären ist, können wir nicht sagen. Die im Durchschnitt aller Werte gefundene Differenz kann aber sehr wohl auf hydrolysierbarem Kohlehydrat beruhen, das in den B-Serien nicht bestimmt wurde. Die in den B-Serien im letzten Extrakt vorhandene reduzierende Substanz war mit Kupfer und Kalk vollständig fällbar.

2. Der Zuckerverlust, der bei Injektion reiner Traubenzuckerlösungen in 30 Minuten stattfindet.

Die Ergebnisse der B-Serie sind in Tabelle III, die der L-Serien in Tabelle IV wiedergegeben. In allen findet sich eine deutlich nach-

Tabelle III.

Zucker allein 30 Minuten.

Datum 1925	Kontrolltiere mg pro 100 g Tier			Versuchstiere mg pro 100 g Tier			Inj. Traubenzucker in mg pro 100 g Tier	Verschwundener Zucker in mg pro 100 g Tier	Bemerkungen
	Traubenzucker	Glykogen	Gesamtkohlehydrat	Traubenzucker	Glykogen	Gesamtkohlehydrat			
31. VII.	62	72	134	222	51	273	226	87	Methode: Alkohol *P. W. S.*, B-Serie V, je 16 Tiere
4. VIII.	61	49	110	218	53	271	227	66	
7. VIII.	59	34	93	212	26	238	224	79	
10. VIII.	60	50	110	220	50	270	226	66	
14. VIII.	57	50	107	239	37	276	229	60	
18. VIII.	45	65	110	222	76	298	228	40	
26. VIII.	64	51	115	218	83	301	230	44	
30. VIII.	61	48	109	189	66	255	229	83	
Mittelwert:	59,1	52,4	111,5	217,5	55,4	272,8	227	66	

Tabelle IV.

Zucker allein 30 Minuten.

Datum	Kontrolltiere mg pro 100 g Tier			Versuchstiere mg pro 100 g Tier			Inj. Traubenzucker in mg pro 100 g Tier	Verschwundener Zucker in mg pro 100 g Tier	Bemerkungen
	reduz. Substanz	Glykogen	Gesamtkohlehydrat	reduz. Substanz	Glykogen	Gesamtkohlehydrat			
1924									
28. VIII.	219	84	303	401	87	488	227	42	Methode: *Parnas* und *Wagner*, L-Serie I, je 8 Tiere
23. IX.	162	53	215	324	58	382	216	49	
13. X.	167	60	227	303	75	378	212	61	
21. X.	150	70	220	309	51	360	228	88	
Mittelwert:	174,5	67	241	334	68	402	221	60	
Korr. Wert:	157	67	224	301	68	369	221	76	
1925									
21. VIII.	—	—	192	—	—	374	215	33	Methode: Totalhydrolyse *P. W. S.*, L-Serie V, je 16 Tiere
25. VIII.	—	—	224	—	—	596	438	66	
28. VIII.	—	—	261	—	—	398	217	80	
1. IX.	—	—	318	—	—	408	181	91	
5. IX.	—	—	270	—	—	468	211	13	
8. IX.	—	—	267	—	—	430	213	50	
10. IX.	—	—	238	—	—	421	216	33	
15. IX.	—	—	291	—	—	465	218	44	
Mittelwert:	—	—	258	—	—	445	239	51	
Korr. Wert:	—	—	232	—	—	401	239	70	
Mittelwerte ohne Vers. v. 25. VIII.	—	—	262	—	—	423	210	49	
Korr. Wert:	—	—	236	—	—	381	210	65	

weisbare Annahme des injizierten Traubenzuckers. Sie ist in den B- und L-Serien nahezu gleich, beträgt im Mittel der L-Serien (24 Tiere) 69 mg, im Mittel der B-Serie (16 Tiere) 66 mg. *Daraus geht hervor, daß*

der verschwundene Traubenzucker nicht in zwischen Traubenzucker und Glykogen gelegene, durch Säure hydrolysierbare Zwischenstufen übergegangen ist. Wäre das der Fall, so müßte der Zuckerverlust in den L-Serien kleinei als in der B-Serie sein. Der Respirationsversuch[1]) hatte ergeben, daß nach Injektion von 290 mg Traubenzucker pro 100 g Hungermaus der respiratorische Quotient in der ersten Stunde leicht sinkt (von 0,761 auf 0,745) und ebenso die Oxydationsgeschwindigkeit (von 103,2 ccm auf 94,2 ccm im Mittel aus fünf Versuchen). *Demnach kann der verschwundene Zucker nicht verbrannt sein,* dagegen kann eine Veresterung mit Phosphat nicht ausgeschlossen werden. Hierbei soll es nach den gegenwärtigen Anschauungen zur Bildung von Fructosediphosphat kommen. Da die Fructose bei dreistündigem Erhitzen mit Mineralsäure zerstört wird, würde durch die Methodik der L-Serien ein Fructosediphosphat nicht gefunden werden. Ebensowenig wird die Methodik der B-Serien ein Hexosediphosphat mit Sicherheit liefern. Dieses würde wohl nur zu einem sehr kleinen Teile in den alkoholischen Extrakt gehen. Hat doch *Jost*[2]) gerade auf die Unlöslichkeit des Hexosediphosphats in starkem Alkohol bei Gegenwart von Calciumacetat eine Methode für die quantitative Bestimmung begründet. Wir müssen daher die Frage, ob das Verschwinden von etwa 30 Proz. des injizierten Zuckers in unseren Versuchen auf Veresterung mit Phosphaten beruht, vorläufig offen lassen. Wir hoffen, unter Benutzung der von *Jost* ausgearbeiteten Methode die Frage weiter klären zu können. Dagegen kann auf Grund unserer Versuche die früher von *Bang*[3]) aufgestellte Meinung, die von manchen Autoren auch heute noch geteilt wird, daß „gewöhnlich mehr als die Hälfte des intravenös gegebenen Zuckers augenblicklich umgewandelt oder derart gebunden wird, daß er im wässerigen Dekokt nicht direkt nachgewiesen werden kann", nicht mehr aufrechterhalten werden. Wir finden ja noch 30 Minuten nach der Injektion 70 Proz. des injizierten Zuckers unverändert wieder, so daß er durch einfache Extraktion mit Alkohol wiedergewonnen werden kann. Der Irrtum von *Bang* erklärt sich dadurch, daß in unseren Versuchen die Glykolyse, die bei der Zerkleinerung der Muskulatur z. B. eintritt, durch die niedere Temperatur verhindert wurde. Die große Rolle, welche diese Zerkleinerungsglykolyse spielt, war, als *Bang* seine Versuche anstellte, noch nicht bekannt[4]).

Um die Genauigkeit der von uns erhaltenen Werte zu schätzen, kann man nach der üblichen Methode der Fehlerrechnung die Ab-

---

[1]) *E J. Lesser*, diese Zeitschr. 153, 41, 1924.
[2]) *Janssen* und *Jost*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 148, 47, 1925.
[3]) *Bang*, Der Blutzucker, S. 81. Wiesbaden 1913.
[4]) Vgl. hierzu *E. J. Lesser*, Die innere Sekretion des Pankreas, S. 9ff. Jena 1924.

weichungen der (in den L-Serien einzeln auf das Volumen der Niederschläge korrigierten) Einzelwerte vom Mittelwert berechnen. Es ergibt sich alsdann als Mittelwert der B- und L-Serien beim Vergleich von 38 Versuchs- und 38 Kontrolltieren, *daß bei intraperitonealer Injektion von 219 mg Glucose in etwa 5proz. Lösung pro 100 g Hungermaus in 30 Minuten 67 $\pm$ 4,5 mg Traubenzucker verschwinden, welche, wie der respiratorische Quotient zeigt, weder verbrannt noch zu Milchsäure oder Fett geworden sein können, da alle diese Vorgänge zu einer Steigerung des respiratorischen Quotienten hätten führen müssen.* Der kurze Ausdruck „es verschwindet Zucker" darf daher nur mit Vorsicht gebraucht werden. Er soll nichts weiter sagen als: Der Zucker ist so verändert, daß er mit den von uns gebrauchten Methoden nicht wiedergefunden werden kann. Wir halten es aber für möglich, daß eine weitere Verbesserung der Methodik auf dem von *Jost* beschrittenen Wege den von uns gefundenen Zuckerverlust wesentlich verkleinern wird.

Eine kurze Bemerkung verdient noch der Versuch der L-Serie V vom 25. August 1925. Hier wurde versehentlich eine doppelt so hoch wie gewöhnlich konzentrierte Traubenzuckerlösung injiziert. Trotzdem hält sich der Zuckerverlust in den gewöhnlichen Grenzen. Es ist also wohl möglich, daß der Prozeß, durch welchen in diesen Versuchen der Zucker verändert wird, bei der Injektion von 220 mg pro 100 g Tier bereits auf das mögliche Maximum seiner Geschwindigkeit angewachsen ist. Indessen ist dies nur eine Möglichkeit, da ja die Werte der Einzelversuche stark schwanken. In der L-Serie V zwischen 13 und 91 mg.

3. Der Zuckerverlust, der bei Injektion von Zuckerlösung und Insulin in 30 Minuten stattfindet.

a) *Die Insulindosis und der Respirationsversuch.* Wir haben früher festgestellt, daß es bei Verwendung von Insulin *Brand* und gleichzeitiger Traubenzuckergabe bei weißen Mäusen eine kritische Insulindosis gibt, deren Überschreitung zu starker Herabsetzung der Oxydationsgeschwindigkeit und damit zu sehr starker Abkühlung der Tiere führt, obwohl diese noch sicher mehr, durch Reduktion nachweisbaren, Traubenzucker enthalten als unbehandelte Hungertiere. Da das Insulin kein reiner Stoff ist, handelt es sich hierbei vielleicht um die Wirkung toxischer Beimengungen. Mag nun diese Vermutung richtig oder falsch sein, in jedem Falle war es nötig, solche toxischen Dosen zu vermeiden. Wir haben daher seinerzeit die Insulindosis ermittelt, welche stets Steigerung des respiratorischen Quotienten ohne stärkere Senkung der Oxydationsgeschwindigkeit herbeiführte. Wir fanden diese Dosis damals im Mittel zu 0,03 klinischen Einheiten pro 100 g Hungermaus. Als wir aber mit dieser Dosis im Herbst 1924 Versuche über den Traubenzuckerschwund (Methode von *Parnas* und *Wagner*) anstellten, er-

hielten wir keinen größeren Traubenzuckerschwund als in den Versuchen, in denen Zuckerlösung allein gegeben war. Als wir daher zu Beginn des Jahres 1925 unsere Versuche in größerem Maße wieder aufnahmen, war es zunächst nötig, die passende Insulindosis herauszufinden. Wir fanden, daß Insulindosen von 0,04 bis 0,06 Einheiten pro 100 g Hungermaus weder Oxydationsgeschwindigkeit noch respiratorischen Quotienten wesentlich änderten, daß dagegen bei einer Dosis von 0,12 Einheiten die toxische Senkung der Oxydationsgeschwindigkeit auftrat. Mit Insulindosen von 0,09 Einheiten pro 100 g Hungermaus wurden alsdann vier Respirationsversuche angestellt. Bei diesen Versuchen, die im übrigen genau wie die Versuche mit chemischer Methodik angestellt wurden, wurde zunächst durch einen etwa 1 Stunde dauernden Versuch der Nüchternwert für Oxydationsgeschwindigkeit und respiratorischen Quotienten ermittelt. Dann erhielten die Tiere die Zucker- und Insulininjektion. Der zweite Respirationsversuch wurde genau 10 Minuten nach der Injektion begonnen und dauerte 30 bis 33 Minuten lang. Das Ergebnis dieser vier Versuche zeigt die Tabelle V. Der für die Zeit von Minute 10 bis Minute 40 berechnete Wert für verbrannten Traubenzucker beträgt 110 mg pro 100 g Tier. Er liegt höher als der früher gefundene Wert, der bei einer Insulindosis von 0,03 Einheiten pro 100 g Hungermaus für die gleiche Zeit 90 mg betragen hatte. Unter Zugrundelegung der damals gefundenen Kurve für den zeitlichen Verlauf der Zuckerverbrennung berechnet sich diese für die Minuten 0 bis 10 in den jetzigen Versuchen auf 49 mg Traubenzucker pro 100 g Tier *und es ergibt sich, daß in den ersten 30 Minuten pro 100 g Tier 128 mg Traubenzucker verbrannt werden und in den ersten 40 Minuten 159 mg*[1]).

Tabelle V.

Respirationsversuche unter Insulin.

Datum 1925	Gewicht des Tieres	Nüchtern Wert		Nach Traubenzucker- und Insulininjektion		Traubenzucker-verbrennung berechnet für 30 Min.	Traubenzucker-verbrenn. berechnet pro 100 g Tier und 30 Min.	Zeit des Insulinversuchs nach der Injektion
		O_2 ccm pro 1 Std.	Respirations-quotient	O_2 ccm pro 1 Std.	Respirations-quotient			
5. II.	21,7	87	0,753	92	0,865	28	128	von 10′ bis 43′
6. II.	21,1	121	0,763	98	0,825	17	80	„ 10 „ 42
9. II.	19,0	110	0,737	96	0,825	23	120	„ 10 „ 40
1. IV.	23,0	117	0,763	104	0,851	26	113	„ 10 „ 40
Mittelwert:	21,2	109	0,754	98	0,841	23,5	110	

In allen, in folgendem zu beschreibenden, Versuchen hat die Insulindosis stets $0{,}09 \pm 0{,}003$ klinische Einheiten pro 100 g Hungermaus betragen.

[1]) Methodik des Respirationsversuchs und Berechnung der verbrannten Zuckermenge siehe *E. J. Lesser*, diese Zeitschr. **158**, 44, 49, 1924.

Tabelle VI.

Insulin, 30 Minuten.

Datum 1925	Kontrolltiere mg pro 100 g Tier			Versuchstiere mg pro 100 g Tier			Inj. Traubenzucker mg pro 100 g Tier	Verschwundener Traubenzucker in mg pro 100 g Tier	Bemerkungen
	Traubenzucker	Glykogen	Gesamtkohlehydrat	Traubenzucker	Glykogen	Gesamtkohlehydrat			
5. III.	90	125	215	171	134	305	206	116	Methode: Alkohol, B-Serie III, je 16 Tiere
10. III.	111	114	225	179	110	290	207	142	
13. III.	114	49	163	158	143	301	223	85	
17. III.	78	96	174	129	94	223	217	168	
29. III.	85	81	166	193	98	291	242	117	
1. IV.	89	140	229	153	127	280	218	167	
5. IV.	73	66	139	182	84	266	219	92	
14. IV.	73	179	152	165	138	303	219	168	
Mittelwert:	89	106	195	166	116	282	219	132	

Tabelle VII.

Insulin in 30 Minuten.

Datum 1925	Gesamtkohlehydrat in mg pro 100 g Tier		Injizierter Traubenzucker pro 100 g Tier mg	Verschwundener Zucker pro 100 g Tier mg	Bemerkungen
	Kontrolltiere	Insulintiere			
20. V.	279	355	217	141	Methode: Totalhydrolyse, L-Serie IV, je 16 Tiere
27. V.	279	350	224	153	
3. VI.	274	368	220	126	
9. VI.	259	361	217	115	
12. VI.	232	316	225	141	
17. VI.	231	312	214	133	
19. VI.	207	256	218	169	
25. VI.	281	308	217	190	
Mittelwert:	255	328	219	146	
Korrigierter Mittelwert:	229	295	219	153	
30. VI.	258	309	221	170	Methode: Totalhydrolyse P. W. S. L-Serie VI, je 16 Tiere
8. VII.	266	390	218	94	
14. VII.	277	418	211	70	
18. IX.	261	322	209	148	
22. IX.	272	305	215	182	
25. IX.	250	355	220	115	
28. IX.	275	375	227	127	
1. X	257	322	210	145	
Mittelwert:	265	350	216	131	
Korrigierter Mittelwert:	238	315	216	139	

b) *Der durch chemische Analyse erhaltene Zuckerverlust.* In Tabelle VI ist die B-Serie, in Tabelle VII die L-Serien der Versuche wiedergegeben, bei denen Zucker und Insulin gleichzeitig gegeben wurde, bei einer Versuchsdauer von 30 Minuten. In der B-Serie beträgt

der gefundene Zuckerverlust 132 mg. In der L-Serie IV 153 mg, in der L-Serie VI 139 mg. Die maximale Differenz der einzelnen Serien beträgt demnach 22 mg, während sie in den Versuchen, in denen Zucker allein injiziert wurde, nur 10 mg betragen hatte. Da aber auch diese Differenz den Fehlergrenzen der Methode noch recht nahe liegt, soll hierauf keine Rücksicht genommen werden und der Mittelwert aus allen drei Serien als endgültiger Wert gezogen werden. *Dann ergibt sich ein Zuckerverlust von 141 mg pro 100 g Hungermaus in 30 Minuten* (*Mittelwert aus 48 Tieren*). Der in gleicher Weise wie oben bei den Versuchen ohne Insulin berechnete mittlere Fehler dieses Wertes beträgt $\pm$ 6 mg. Durch die gleichzeitige Insulingabe wird also der Zuckerverlust von 67 auf 141 mg gesteigert; er nimmt also auf etwas über das Doppelte zu. Der Prozeß, durch welchen der Zucker verschwindet, ist aber jetzt ein anderer. Das beweist die gleichzeitige Steigerung des respiratorischen Quotienten. Aus dieser und der Oxydationsgeschwindigkeit hatten wir eine Verbrennung von 128 mg Traubenzucker berechnet. Wir finden durch die chemische Analyse einen etwas größeren Zuckerverlust, nämlich 141 mg. *Die Differenz zwischen berechnetem und gefundenem Zuckerverlust beträgt 13 mg oder 11 Proz. des berechneten Wertes.* Diese Differenz fällt fast in die Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode. Sie macht es sehr wahrscheinlich, daß aller Zucker, der unter Insulinwirkung verschwindet und nicht zu Glykogen geworden ist, oxydiert wird. Um einerseits die Genauigkeit unserer Methodik noch weiter zu prüfen, andererseits nachzusehen, ob auch zu einem anderen Zeitpunkt die berechnete Zuckerverbrennung und der durch die chemische Analyse zu findende Zuckerverlust von gleicher Größenordnung sind, haben wir noch drei weitere Versuchsserien angestellt, in denen das Insulin 40 Minuten im Tierkörper wirken konnte.

Wir haben endlich in der Serie VI bei je sechs Versuchs- und je sechs Kontrolltieren die Differenz zwischen beiden im Gesamtkohlehydratgehalt nach zwei verschiedenen Methoden ermittelt, einmal nach der bereits angegebenen Methode, das zweite Mal, indem wir aus dem eingeengten Filtrat vom Schwefelquecksilber die Kohlehydrate mit der Kupfer-Kalkfällung ausfällten, um zu zeigen, daß die bei der Totalhydrolyse mitbestimmten reduzierenden Substanzen, welche keine Kohlehydrate sind, bei *diesen* Versuchen, in denen es *nur* auf die Ermittlung der Differenz zwischen Versuchs- und Kontrolltieren ankommt, nicht stören. Im Mittel aus sechs Tieren fanden wir diese Differenz nach der Methode der Totalhydrolyse zu 29,9 mg, nach der Kupfer-Kalkmethode zu 29,6 mg. Beide Methoden liefern daher für die Differenz im wesentlichen übereinstimmende Werte.

4. Der Zuckerverlust, der bei Injektion von Traubenzucker und Insulin in 40 Minuten stattfindet.

Die Ergebnisse der 40 Minuten dauernden Versuche zeigen die Tabellen VIII und IX. Der gefundene Zuckerverlust beträgt in der

Tabelle VIII.

Insulin, 40 Minuten.

Datum 1925	Kontrolltiere mg pro 100 g Tier			Versuchstiere mg pro 100 g Tier			Injizierter Traubenzucker mg pro 100 g Tier	Verschwundener Traubenzucker mg pro 100 g Tier	Bemerkungen
	Traubenzucker	Glykogen	Gesamtkohlehydrat	Traubenzucker	Glykogen	Gesamtkohlehydrat			
18. V.	75	60	135	121	76	197	232	170	Methode: Alkohol, B-Serie IV, je 16 Tiere
22. V.	55	77	132	118	71	189	230	173	
25. V.	57	57	114	113	115	228	230	116	
2. VI.	87	65	152	135	115	250	222	124	
14. VI.	106	83	189	143	96	239	216	166	
19. VI.	97	81	178	145	87	232	220	166	
23. VI.	75	91	166	145	95	240	222	148	
26. VI.	98	84	182	152	108	260	231	153	
Mittelwert:	81	75	156	134	95	229	225	152	

Tabelle IX.

Insulin, 40 Minuten.

Datum 1925	Kontrolltiere mg pro 100 g Tier			Versuchstiere mg pro 100 g Tier			Injizierter Zucker mg pro 100 g Tier	Verschwundener Zucker mg pro 100 g Tier	Bemerkungen
	reduzierende Substanz	Glykogen	Gesamtkohlehydrat	reduzierende Substanz	Glykogen	Gesamtkohlehydrat			
17. II.	187	75	262	230	111	341	202	123	Methode: *Parnas* und *Wagner*, L-Serie II, je 10 Tiere
25. II.	195	72	267	235	71	306	229	190	
10. III.	214	61	275	234	66	300	215	190	
16. III.	153	76	229	171	90	261	217	185	
23. III.	155	60	215	232	72	304	214	125	
Mittelwert:	181	69	250	220	82	302	215	163	
Korrigierter Mittelwert:	163	69	232	198	82	280	215	167	
27. IV.	—	—	254	—	—	347	218	125	Totalhydrolyse, L-Serie III, je 2 Tiere
5. V.	—	—	250	—	—	290	216	176	
Mittelwert:	—	—	252	—	—	319	217	150	
Korrigierter Mittelwert:	—	—	227	—	—	288		156	
6. X.	—	—	253	—	—	385	218	86	Methode: Totalhydrolyse *P. W. S.*, L-Serie VII, je 16 Tiere
8. X.	—	—	255	—	—	334	220	141	
14. X.	—	—	281	—	—	338	215	158	
16. X.	—	—	215	—	—	291	216	140	
20. X.	—	—	223	—	—	333	226	116	
22. X.	—	—	235	—	—	299	220	156	
27. X.	—	—	261	—	—	300	217	178	
29. X.	—	—	251	—	—	303	211	159	
Mittelwert:	—	—	247	—	—	323	218	142	
Korrigierter Mittelwert:	—	—	222	—	—	291		149	

Tabelle X.

Zahl der Tiere, aus denen der Mittelwert gezogen wurde	Mittleres Gewicht der		Insulindosis pro 100 g Tier klinische Einheiten	Injizierte Zuckermenge pro 100 g Tier in mg	Versuchsdauer Min.	Verbrannte Zuckermenge in mg pro 100 g Tier (Respirationsversuch)	Laut chemischer Analyse verschwundene Zuckermenge in mg pro 100 g Tier
	Kontrolltiere	Versuchstiere					
38	20,96	21,00	0	219	30	0	67 ± 4,5
48	20,6	20,7	0,09	218	30	128	141 ± 6
46	20,8	20,7	0,09	220	40	159	155 ± 5

B-Serie 152 mg, in der L-Serie II 167 mg, der L-Serie III 156 mg und der L-Serie VII 149 mg. Die maximale Differenz zweier Serien (B-Serie zu L-Serie II) beträgt 15 mg. Also besteht zwischen den B- und L-Serien keine die Fehlergrenzen erheblich übersteigende Differenz. *Der aus 46 Versuchs- und 46 Kontrolltieren gezogene Mittelwert beträgt 155 ± 5 mg. Er stimmt mit dem auf Grund der Respirationsversuche für den in 40 Minuten verbrannten Zucker berechneten Wert von 159 mg überein.* Die Differenz liegt völlig in der Fehlergrenze der Versuchsmethode. Diese Differenz war im 30-Minuten-Versuch größer, hier war ferner die berechnete Zuckerabnahme kleiner als die gefundene. Es *kann* dies damit zusammenhängen, daß in den ersten 30 Minuten auch unter Insulinwirkung der Prozeß noch eine geringe Rolle spielt, durch welchen injizierter Zucker so verändert wird, daß er mit unserem analytischen Verfahren nicht mehr nachweisbar ist (ohne dabei aber verbrannt zu werden und damit den respiratorischen Quotienten zu steigern). Es scheint uns auf Grund von allerdings noch zu wenig zahlreichen Versuchen, daß der, bei der Injektion von Zucker allein in den ersten 30 Minuten scheinbar verschwindende Zucker später unter Steigerung des respiratorischen Quotienten verbrannt wird. Die Verbrennung beginnt etwa 60 Minuten nach der Injektion. Dieser Prozeß, den wir in den ersten 30 Minuten nach Zuckerinjektion fanden, könnte vielleicht auch der Verbrennung des Zuckers bei Gegenwart von injiziertem Insulin vorangehen. Er würde aber in diesem Falle durch die rapide Verbrennung des Traubenzuckers überlagert werden und wohl nur in den ersten Minuten nach der Injektion bei der Maus deutlich nachweisbar sein. Denn die nach 30 Minuten gefundene Differenz zwischen dem laut chemischer Analyse verschwundenen Zucker und der auf Grund des Respirationsversuchs berechneten Zuckerverbrennung liegt den Fehlergrenzen der Methodik zu nahe, um sichere Schlüsse zu gestatten. *Für* unsere Hypothese könnte der Befund von *Krogh*[1]) angeführt werden, der beim kurarisierten Kaninchen fand, daß die Senkung

[1]) *A. Krogh*, Deutsch. med. Wochenschr. 49, 1321, 1923.

des Blutzuckers bei der Insulinwirkung der Steigerung des respiratorischen Quotienten zeitlich voranging.

Das Ergebnis sämtlicher Versuche haben wir zur klareren Veranschaulichung noch einmal in Tabelle X zusammengefaßt, die auch das Mittelgewicht der benutzten Versuchs- und Kontrolltiere, sowie den Mittelwert der injizierten Traubenzuckermenge enthält. Die Tabelle sagt aus: Bei Injektion von 219 mg Zucker verschwinden in 30 Minuten 67 mg Traubenzucker pro 100 g Tier, welche nicht verbrannt sein können oder durch einen Prozeß verändert, welcher wie Milchsäure- oder Fettbildung den respiratorischen Quotienten beeinflussen würde. Bei gleichzeitiger Insulingabe von 0,09 klinischen Einheiten pro 100 g Tier verschwinden in 30 Minuten 13 mg Traubenzucker (entsprechend 11 Proz. des injizierten Traubenzuckers) mehr, als laut Berechnung des Respirationsversuchs verbrannt sind, in 40 Minuten 4 mg weniger. Die Differenz in dem gesamten Kohlehydratgehalt der Tiere zwischen der 30. und 40. Minute sollte auf Grund der Berechnung des Respirationsversuches 31 mg betragen. Sie beträgt nur 14 mg. Es findet sich also eine Differenz für diesen Wert von 17 mg zwischen dem berechneten und dem gefundenen Wert. Diese Differenz liegt den Fehlergrenzen der Methodik so nahe, daß es uns nicht möglich scheint, aus ihr weitere Schlüsse zu ziehen.

Die Hypothese der *Mac Leod*schen Schule, daß der unter Insulinwirkung verschwindende Zucker zum größeren Teile nicht verbrannt, sondern in eine unbekannte Verbindung umgewandelt werde, ist durch diese Versuche unmöglich gemacht. Es gibt zwar einen Prozeß, bei dem der Zucker scheinbar verschwindet, ohne verbrannt zu werden. Dieser Prozeß findet sich aber, deutlich ausgesprochen und quantitativ faßbar, nur beim Hungertier. Für dieses hat es *Staub*[1]) aber recht wahrscheinlich gemacht, daß es unter Insulin*mangel* steht. Wir möchten außerdem noch einmal betonen, daß dieses Verschwinden von Zucker beim Hungertier, für das im Gaswechsel kein Äquivalent gefunden werden kann, wohl nur ein scheinbares ist. Es handelt sich vielleicht nur um eine Änderung der Reduktionskraft des injizierten Kohlehydrats. Ferner könnte eine Veresterung mit Phosphat das scheinbare Verschwinden in unseren Versuchen ganz oder zum Teil erklären. Es handelt sich bei diesem Vorgang wohl um den seit langem bekannten Prozeß, den wir früher auf die Glykogenarmut der Leber zurückführen wollten. Er kommt, wie es scheint, in quantitativ faßbarer Weise nur zum Vorschein, wenn einem Hungertier größere Kohlehydratmengen zugeführt werden. Wir wollen ihn in Zukunft nach seinem Entdecker *Johannsen*[2]) als Johanneneffekt bezeichnen.

[1]) *H. Staub*, Insulin, 2. Aufl., S. 88ff. Berlin, Springer, 1925.

[2]) *Johannsen*, Skand. Arch. Phys. **21**, 1, 1909.

Wir halten es jetzt für recht wahrscheinlich, daß die von *Staub*[1]) für den Johanneneffekt gegebene Erklärung richtig ist. In diesem Falle bliebe nur noch die Frage aufzuklären, welche chemische Veränderung es ist, durch die in unseren Versuchen die Reduktionsfähigkeit des injizierten Zuckers in den ersten 30 Minuten um etwa 30 Proz. abnimmt.

5. *Das Verhalten des Glykogens.*

Sämtliche erhaltene Glykogenwerte sind in der Tabelle XI zusammengestellt.

Tabelle XI.

Die Änderungen des Glykogengehalts.

Datum 1925	Tierzahl	Versuchsdauer Min.	Mittelgewicht eines Tieres in g		Injiziert wurden pro 100 g Tier	Glykogen in 100 g Tier in mg		Glykogen in mg gebildet pro 100 g Tier	Bemerkungen	
			Versuchstiere	Kontrolltiere		Kontrolltiere	Versuchstiere			
August 24. XI.	16	30	20,4	20,6	227 mg Tz.	52	55	3	B-Serie V	
	6	30	19,3	19,27	218 „ „	81	88	7	Anal. L	
Mittelwert:	22	—	—	—	225	60	64	4		
11. V.	7	15	21	23	226 mg Tz.	48	81	33	Anal. B	Insulin 0,09 klin. Einheiten pro 100 g Tier
5. XI.	6	15	17,9	17,9	215 „ „	64	84	20	„ L	
10. XI.	5	15	17,9	17,7	218 „ „	66	64	— 2	„ L	
Mittelwert:	18	—	—	—	220	58	77	19		
März 17. XI.	16	30	20,6	20,4	216	106	116	10	B-Serie III	
	6	30	18,9	18,9	213	67	83	16	Anal. L	
Mittelwert:	22	—	—	—	215	95	107	12		
Mai	16	40	20,8	20,8	225	75	95	20	B-Serie IV	

Drei Werte entstammen den B-Serien III, IV und V und stellen die Mittelwerte aus je acht Einzelversuchen dar, die nach der bereits mitgeteilten Methode erhalten wurden. Bei den übrigen in der Tabelle mitgeteilten Analysen wurde in folgender Weise verfahren. Die in der üblichen Weise vorbehandelten Tiere wurden eins nach dem anderen mit der Zucker- oder der Zucker-Insulinlösung injiziert. Der Moment der Injektion wurde jedesmal durch einen Assistenten notiert. Eine dem Gesamtgewicht der Tiere entsprechende Menge 60proz. Kalilauge wurde unterdessen in einem großen Kjeldahlkolben im siedenden Wasserbade auf 100° erhitzt. War die entsprechende Zeit nach der Injektion vergangen, so gab dies der Assistent an. Das betreffende Tier wurde dann durch Schlag auf den Kopf getötet, sofort unzerkleinert in die heiße Kalilauge geworfen und kräftig umgeschüttelt. Gleichzeitig behandelte eine zweite Person das dem betreffenden Injektionstier entsprechende Kontrolltier in genau derselben Weise. Wenn alle Tiere sich in der Kalilauge befanden, wurde nochmals längere Zeit kräftig geschüttelt und die Analyse nach *Pflüger* zu Ende geführt. Die

[1]) *Staub*, Insulin, 2. Aufl., S. 70ff.

Mittelwerte sind stets (wie auch in allen vorausgehenden Tabellen) in folgender Weise gezogen. Wenn beispielsweise ein Mittelwert aus 16 Tieren und einer aus 6 Tieren vorlag, wurden beide vereinigt, indem der erste mit 16, der zweite mit 6 multipliziert wurde. Die beiden so erhaltenen Größen wurden addiert, die Summe durch 22 dividiert.

Die Tabelle ergibt zunächst für die Zeit 30 Minuten nach der Injektion von Traubenzucker eine Zunahme von 4 mg Glykogen pro 100 g Tier, das entspricht 6,7 Proz. des Glykogengehaltes der Kontrolltiere. Demnach ist nicht mit Sicherheit zu sagen, ob bei Injektion von Zucker innerhalb der nächsten 30 Minuten eine minimale Glykogenbildung stattfindet oder nicht. Wird dagegen außer Traubenzucker noch Insulin injiziert, so beträgt die Glykogenzunahme bereits 15 Minuten nach der Injektion 19 mg oder 33 Proz. des Glykogengehaltes der Kontrolltiere. Es kann also keinem Zweifel unterliegen, daß das Insulin ebenso wie die Oxydation des Traubenzuckers auch seine Polymerisierung zu Glykogen erheblich beschleunigt und auch in diesem Punkte kann die Anschauung der *Mac Leod*schen Schule nicht mehr aufrechterhalten werden. Eine halbe Stunde nach der Insulininjektion beträgt die Glykogenbildung 12 mg, hat also gegenüber der nach 15 Minuten gefundenen um 7 mg abgenommen, nach 40 Minuten wird sie wieder zu 20 mg gefunden. Die Abnahme des Glykogens zwischen der 15. und 30. Minute ist vermutlich auf eine weniger gute Übereinstimmung des Glykogengehaltes der Versuchs- und Kontrolltiere vor der Injektion zurückzuführen. Würde man die Zahl der analysierten Tiere noch weiter vermehren, so würde sich die Glykogenbildung nach 30 Minuten wahrscheinlich zu der gleichen Größe erheben wie für die Zeit 15 bis 40 Minuten nach der Injektion. Demnach ergibt sich, daß unter unseren Versuchsbedingungen sofort nach der Insulininjektion eine Glykogenbildung stattfindet, die bereits spätestens nach 15 Minuten ihr Maximum erreicht hat. Von da an bleibt das neugebildete Glykogen konstant, obwohl der Gehalt des Tieres an freiem Zucker dauernd rasch sinkt. Wenn wir daher nach dem Vorgange von *Meyerhof* den Quotienten:

$$\frac{\text{gesamter verschwundener Traubenzucker}}{\text{verbrannter Traubenzucker}}$$

bilden wollen, müssen wir die Verhältnisse, die sich 15 Minuten nach der Injektion finden, zugrunde legen. Für die Zeit von 15 Minuten ergibt die Rechnung auf Grund des Respirationsversuches eine Traubenzuckerverbrennung von 71 mg pro 100 g Tier. Die chemische Analyse ergibt eine gleichzeitige Synthese von 19 mg Glykogen Wenn also 71 mg Traubenzucker verbrennen, verschwinden im ganzen 90 mg Traubenzucker oder pro 1 Mol verbrannten Traubenzuckers verschwinden 1,27 Mole Traubenzucker. *Meyerhof* fand am Muskel hierfür

einen Wert von 2 bis 6 Molen. Unser Wert liegt also ganz erheblich niedriger, er liegt aber auch niedriger als die Werte, die sich aus den Versuchen von *Burn* und *Dale*[1]), sowie von *Ringer*[2]) berechnen. Es geht indessen aus den Versuchen ven *Boukaert* und *Stricker*[3]) hervor, daß auch erheblich höhere Quotienten gefunden werden können. Daraus, daß in unseren Versuchen das Maximum der Glykogensynthese bereits nach 15 Minuten erreicht wird, möchten wir schließen, daß die Geschwindigkeit der Glykogensynthese unter Insulinwirkung (neben der Größe der Insulindosis) vor allem von der Zuckerkonzentration im Gewebe abhängig ist. Beide Größen zu verändern, war bei unserer Versuchsanordnung nicht gestattet. Würde man beide Größen variieren, so wären vielleicht auch bei der hungernden Maus Verhältnisse erhaltbar, bei denen die Glykogensynthese im Verhältnis zur Glucoseoxydation überwiegen würde.

Im ganzen haben die im vorstehenden mitgeteilten Versuche unsere vor 2 Jahren geäußerte Hypothese, daß die Insulinwirkung zum größten Teile in einer Beschleunigung des gekoppelten Prozesses von Traubenzuckerverbrennung und Glykogensynthese bestehe, vollauf bestätigt. Unterdessen haben die grundlegenden Versuche von *Burn* und *Dale* zu Ergebnissen geführt, welche mit den unserigen im wesentlichen übereinstimmen. Wenn manche Autoren auf dem Insulingebiet in letzter Zeit einen möglichst weitgetriebenen Skeptizismus an den Tag legen und sich zum sokratischen *ουδεν οιδα* bekennen (was dann freilich eigene weitgehende Hypothesen nicht ausschließt), so liegt das meist daran, daß sie gerade diese wichtigen Versuche von *Burn* und *Dale* mit Schweigen übergehen. Warum wir einen derartigen Skeptizismus für unbegründet halten, haben wir an anderer Stelle dargelegt. Wir glauben durch die vorliegenden Versuche unsere Anschauung nunmehr auch experimentell begründet zu haben.

Es sei zum Schlusse noch kurz auf eine bemerkenswerte Analogie zwischen unseren Versuchen und den Arbeiten über den totalen Phlorrhizindiabetes hingewiesen, wie sie besonders aus dem *Lusk*schen Institut hervorgegangen sind. Das im totalen Phlorrhizindiabetes befindliche Tier kann nach den Angaben der *Lusk*schen Schule kein zugeführtes Kohlehydrat verbrennen. Gibt man ihm Insulin, so verbrennt es aber, wie *Ringer* gezeigt hat, den zugeführten Traubenzucker. Wenn dabei im Phlorrhizintier 100 Teile Traubenzucker verschwinden, werden 60 Teile verbrannt, 40 Teile zu Glykogen. In den ersten 30 Minuten nach der Injektion von Traubenzucker bei der Hunger-

---

[1]) *Burn* und *Dale*, Journ. of Phys. 59, 164, 1924.
[2]) *Ringer*, Journ. of biol. Chem. 58, 483, 1923.
[3]) *Boukaert* und *Stricker*, Soc. biol. 91, 102, 1924.

maus haben wir genau die gleichen Verhältnisse. Von dem injizierten Traubenzucker kann nichts verbrannt werden. Gibt man gleichzeitig noch Insulin, so beginnt dagegen sofort die Traubenzuckerverbrennung. Von 100 Teilen Traubenzucker, welche nach 15 Minuten verschwunden sind, werden 80 verbrannt und 20 zu Glykogen synthetisiert. Es besteht mithin eine weitgehende Analogie. Nur die quantitativen Verhältnisse sind etwas verschieden, vermutlich weil die Gluconeogenie aus Eiweiß beim Phlorrhizintier und beim Hungertier verschieden ist.

Der Zwiespalt, den man eine Zeitlang zwischen der Insulinwirkung beim normalen Hungertier und beim pankreasdiabetischen Tiere sehen wollte, besteht daher nicht. Wählt man die Insulindosis richtig, d. h. nicht toxisch, und gibt gleichzeitig Kohlehydrat, so daß die abnorm hohe Gluconeogenie, welche das Phlorrhizintier ebenso wie das pankreasdiabetische Tier zeigt, irgendwie nachgeahmt wird, so ergibt sich auch beim Hungertier das bekannte Bild der Insulinwirkung, das schon *Bantings* erste Versuche am pankreasdiabetischen Hunde brachten: Beschleunigung der Zuckerverbrennung und Beschleunigung der Glykogensynthese.

Über Fällung des Traubenzuckers nach Salkowski-van Slyke.

Von

E. Bissinger.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1925.)

In der biochemischen Methodik wird der Traubenzucker meistens durch Reduktionsmethoden quantitativ bestimmt. Dabei entsteht häufig die Frage, wieweit Nicht-Kohlenhydrate an der Gesamtreduktion beteiligt sind. Um dies zu entscheiden, hat man meistens die sogenannte „Restreduktion“ bestimmt, welche nach vollständiger Vergärung durch Hefe noch übrig bleibt, ein, namentlich bei kleinen Zuckermengen, nur schwierig durchzuführendes Verfahren. Ich habe nachgesehen, ob die Methode, den Traubenzucker nach *Salkowski-van Slyke*[1]) mit Kupfer und Kalk zu fällen, für solche Zwecke vielleicht brauchbar ist. Die Frage war, ob der durch Kupfer und Kalk ausgefällte Traubenzucker nach Lösung in Essigsäure und Entfernung des Kupfer- und Calciumacetats (durch Fällung mit Schwefelwasserstoff und Kaliumoxalat) bei der Reduktionsanalyse quantitativ wieder erhaltbar wäre. Dies ist in der Tat der Fall. Bei Verwendung von 20 und 34 mg Glucose werden, wie die Tabelle zeigt, 96 bis 100 Proz. wieder gefunden. Ebenso

Angewendet mg	Wiedergefunden mg	Verlust Proz.	Zuckerart
24,9	24,4	2	Glucose
	23,9	4	
19,7	19,5	1	
	19,2	3	
33,9	33,6	1	
	34,0	0	
26,9	26,4	2	
29,7	29,1	2	
	29,7	0	
40,8	39,8	3	Lävulose
38,1	37,6	2	

[1]) *Salkowski*, Pflügers Arch. **6**, 220, 1872; Zeitschr. f. physiol. Chem. **3**, 79, 1879; *S. Yoshimoto*, ebendaselbst **56**, 425, 1908; *Worm, Müller* und *Hagen*, Pflügers Arch. **17**, 568, 1878; *C. Neuberg*, Kohlenhydrate im Hdb. d. Biochem. von *Oppenheimer*, II. Aufl., **1**, 502; *van Slyke*, Journ. of. biol. Chem. **32**, 455, 1917; mir im Orginal nicht zugänglich.

verhält sich die Lävulose, von der 97 bis 98 Proz. wiedergefunden wurden. Notwendig ist es dabei, solange der Traubenzucker bei alkalischer Reaktion mit dem Kupfersalz in Berührung ist, stark zu kühlen. Das im einzelnen von mir angewendete Verfahren ist im folgenden kurz beschrieben:

In einem etwa 75 ccm fassenden Zentrifugenglas werden bis 30 ccm Zuckerlösung, 4 ccm 10proz. Kupfersulfatlösung und 10 ccm 10proz. Kalkmilch vermischt. Sämtliche Lösungen waren vor der Mischung auf 0° abgekühlt. Das Gemisch bleibt unter Schütteln 20 Minuten bei 0° stehen, dann wird scharf zentrifugiert. Die Gläserträger der Zentrifuge, welche die Kupferkalkmischung aufnehmen, werden vorher durch Einpacken in eine Kältemischung auf etwa —15° abgekühlt. Vom Zentrifugenrückstand wird abgegossen; ohne auszuwaschen, wird dieser in 20 ccm Wasser von 0° aufgeschwemmt. Unter ständigem Rühren werden 5 ccm 50proz. Essigsäure zugesetzt. Nach erfolgter Lösung (weiße Trübung von Gips belanglos) wird in ein 50-ccm-Meßkölbchen übergeführt und aufgefüllt. Das Kupfer wird mit Schwefelwasserstoff entfernt; nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs aus dem Filtrat vom Schwefelkupfer werden 45 ccm in ein 75 ccm fassendes Zentrifugenglas pipettiert. Dieses wird im Wasserbad auf 100° erhitzt und mit 9,5 bis 10 ccm kochender 25proz. Kaliumoxalatlösung versetzt. Nach der Fällung wird noch eine Viertelstunde im kochenden Wasserbad belassen, dann wird das Calciumoxalat abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit muß kalkfrei sein (Prüfung mit Kaliumoxalat). Sie wird in eine gläserne Abdampfschale abgegossen, das Calciumoxalat wird dreimal mit je 10 ccm Wasser ausgewaschen, die Waschwässer werden zu dem ersten Zentrifugat hinzugesetzt und nach Einengen auf passendes Volumen der Zucker nach *Bertrand* bestimmt. Der im Filtrat befindliche Überschuß von Oxalat braucht nicht entfernt zu werden, da Kontrollversuche ergeben haben, daß die Anwesenheit entsprechender Oxalatmengen in reinen Traubenzuckerlösungen den exakten Ablauf der Bertrandbestimmung nicht beeinträchtigt.

Über die Gewichtsanalyse der Eiweißkörpergruppen des menschlichen Blutplasmas bei erlaubter Verarbeitung von Salzplasma.

Von

Wilhelm Starlinger.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1925.)

I. Einleitung und Fragestellung.

Es darf grundsätzlich gefordert werden, daß jede methodische Beurteilung von Eigenschaften oder Bestandteilen biologischer Flüssigkeiten von der Prüfung derselben in nativem (d. h. in keinerlei Weise künstlich beeinflußtem) Zustande ausgehen muß: Die Einführung fremder Einwirkungen zum Zwecke methodisch-technischer Vereinfachung darf erst dann in Betracht gezogen werden, wenn der experimentelle Nachweis gleichen Prüfungsergebnisses im nativen und künstlich beeinflußten Substrat erbracht wurde.

Diese Forderung wurde bis in die jüngste Zeit bei Verarbeitung des menschlichen Blutplasmas nicht berücksichtigt: Es kam bei verschiedenster Fragestellung lediglich künstlich in mannigfacher Weise zum Zwecke der Gerinnungsverhinderung beeinflußtes Plasma zur Verwendung; ebenso wurde auch die maßanalytische Bestimmung der Eiweißkörpergruppen bis vor kurzem ausnahmslos im künstlichen Plasma durchgeführt.

Da nun einerseits die Gewinnung und Verarbeitung nativen menschlichen Blutplasmas zwar durchaus regelmäßig gelingt, jedoch mit gewissen technischen Schwierigkeiten verbunden ist, andererseits aber die Gerinnungsverhinderung durch entsprechende Zusätze eine große Zeit- und arbeitstechnische Förderung vermittelt, scheint es angebracht, die letztere Möglichkeit im Rahmen aller jener Versuchsanordnungen auszunutzen, für welche die eingangs aufgestellte Forderung durch entsprechende experimentelle Prüfung erfüllt wurde.

In vorausgehenden Mitteilungen[1]) wurde im Rahmen einer zusammenfassenden theoretischen und experimentellen Prüfung der quantitativen Bestimmung der gerinnungsfähigen Eiweißkörpergruppe des menschlichen Blutplasmas (des sogenannten „Fibrinogens") der Nachweis geführt, daß die gravimetrische Bestimmung derselben ein gleiches Ergebnis im spontan geronnenen Nativplasma und im recalcifizierten Salzplasma vermittelt: Es darf also die Verarbeitung entsprechend gewonnenen Kunstplasmas zum Zwecke der Wägungsbestimmung des gerinnungsfähigen Plasmaeiweißes als statthaft bezeichnet werden[2]).

In weiteren Mitteilungen[3]) wurde im Rahmen gleicher Prüfung hinsichtlich der beiden wichtigsten Serumeiweißkörpergruppen: der $(NH_4)_2SO_4$-Halbsättigungsfraktion (der sogenannten „Globuline") und der $(NH_4)_2SO_4$-Ganzsättigungsfraktion (der sogenannten „Albumine") die gravimetrische Bestimmung nach entsprechendem Ausbau als besonders leistungsfähig erkannt. Eine Prüfung des Einflusses fremder Salzanwesenheit wurde nicht durchgeführt, da bei Verarbeitung gewöhnlichen Vollblutserums oder aus nativem Plasma gewonnenen Plasmaserums derartige Zusätze sich in der Regel erübrigen. Da sich aber bei biologischen Serienversuchen die Notwendigkeit einfachster Methodik bei größter Zuverlässigkeit und geringem Materialverbrauch ergibt, welche Forderungen im Rahmen der Maßanalyse der menschlichen Plasmaeiweißkörper nur erfüllt werden können, wenn einerseits doppelte Gewinnung des Ausgangssubstrats, andererseits überflüssige Blutentnahme vermieden wird, erweist sich die gleichzeitige Bestimmung aller drei großen Eiweißkörpergruppen im Salzplasma als vorteilhaft.

Im folgenden soll die Methodik und experimentelle Kritik eines derartigen Verfahrens, welches sich bei großer Zuverlässigkeit und geringem Materialverbrauch als besonders expeditiv bewährt hat, kurze Darstellung finden.

II. Die Prüfung der methodischen Grundlage.

Die Verwertung maßanalytischer Ergebnisse bei Verarbeitung besalzten Blutplasmas erfordert, falls der Zusatz des Salzes zum Vollblut und nicht zum vorher vom zelligen Blutanteil befreiten Plasma vor-

[1]) Diese Zeitschr. 140, 1923; 148, 1924; 157, 1925.

[2]) Es muß ausdrücklich betont werden, daß diese Feststellung wohl für die gravimetrische Analyse, nicht aber z. B. für die beliebte refraktometrische Bestimmung Geltung besitzt, in deren Rahmen die Verarbeitung von Salzplasma unzulässig ist, da der Salzzusatz Änderungen der spezifischen Refraktion nach sich zieht.

[3]) Diese Zeitschr., Mitteilung I bis III, 160, 1925.

genommen wird (in welchem Falle der angestrebte Zweck der Arbeitserleichterung hinfällig würde), die genaue Kenntnis des Mengenverhältnisses: Blutplasma/Blutzellen; diese Bestimmung kann einerseits nur nach dem Hämatokritprinzip erfolgen, darf aber andererseits keine arbeitstechnische Belastung bedeuten; diese kann nur vermieden werden, wenn die Hämatokritbestimmung im Rahmen des Hauptverfahrens zur Durchführung kommt, also im Salzplasma erfolgen darf.

Diese Forderung kann in folgender Weise erfüllt werden: Die Zentrifugierröhrchen, in denen zelliger und flüssiger Blutanteil getrennt werden, dienen in der Weise unmittelbar als Hämatokritröhrchen, daß ihre lichte Weite peinlich gleich gehalten und der Röhrchenboden flach angeschliffen wird; die Röhrchen tragen drei Marken, welche Mengen abgrenzen, die sich wie 1 : 9 : 10 verhalten, also bei Verwendung des Mindestvolumens von 2,5 ccm: 0,25 — 2,25 — 2,5 ccm entsprechen; die Volumina zwischen Boden und erster Marke sowie zwischen mittlerer und oberster Marke sind also gleich. Wird nun das Röhrchen mit einer Salzlösung, welche einerseits die Gerinnung verhindert, andererseits das Volumen der Blutzellen nicht ändert, bis zur untersten Marke beschickt, mit Blut bis zur obersten aufgefüllt und darauf bis zur Volumenkonstanz des zelligen Sediments zentrifugiert, so verhalten sich zelliger und flüssiger Blutanteil wie die mit dem Millimetermaß ablesbare Entfernung: Röhrchenboden/obere Sedimentgrenze und die Entfernung: Sedimentgrenze/mittlere Marke; die durch die Salzlösung bewirkte Plasmaverdünnung aber ergibt sich aus dem Verhältnis der Entfernung: obere Sedimentgrenze/oberste Marke zur Entfernung: Sedimentgrenze/mittlere Marke.

Als Voraussetzung der Methode hat zu gelten, daß das Blutkörperchenvolumen durch den Salzzusatz nicht verändert wird. Die Voraussetzung besteht zu Recht, wenn der Vergleich der Zellvolumenbestimmung im nativen Blute und im Salzblut gleiche Werte ergibt.

Versuchsreihe 1. Die solcherweise bei Verwendung blutisotonischer (3,6 proz.) Natriumcitratlösung durchgeführte Parallelbestimmung ergab in acht Versuchen *einer* Serie viermal eine Differenz von je 1 Proz. Zellvolumen (bezogen auf 100 Proz. Gesamtblut); viermal kamen identische Werte zur Beobachtung.

Die Übereinstimmung zwischen Parallelbestimmungen des Zellvolumens in Nativ- und Citratblut darf demnach als sehr gut bezeichnet werden: Der Zusatz 3,6 proz. Citratlösung zu Blut im Verhältnis 1 : 9 beeinträchtigt also das Volumen der Blutzellen nicht und darf berechtigterweise in Anwendung kommen.

Um die technische Fehlermöglichkeit der Bestimmung festzulegen, wurde weiter der Vergleich des Resultats zwischen Paralleluntersuchungen in Citratblut durchgeführt.

Versuchsreihe 2. In 31 Parallelbestimmungen *einer* Serie wurde neunmal eine Differenz von 1 Proz. Zellvolumen, 22mal keine Differenz beobachtet.

Die Übereinstimmung darf als sehr gut bezeichnet werden, die Fehlermöglichkeit liegt wie in der vorausgehenden Versuchsreihe innerhalb der Fehlergrenzen der Ablesung.

Nachdem solcherweise die Berechtigung der Hämatokritbestimmung im Rahmen der verwendeten Methodik als erwiesen gelten darf, muß im folgenden der gleiche Nachweis für die Eiweißgruppenfraktionierung geführt werden.

Da für das gerinnungsfähige Eiweiß gleiche quantitative Abscheidung aus Nativplasma durch Spontangerinnung und aus Citratplasma bei Recalcifikation bereits nachgewiesen wurde (l. c.), bleibt lediglich der Nachweis zu führen, daß die in Anwendung gebrachten Salze (Natriumcitrat, Calciumchlorid) keinen Einfluß auf die Fällungsgrenzen des Ammoniumsulfats besitzen.

Natriumcitrat allein bewirkt erst in hohen Konzentrationen eine Abschwächung der Fällungswirkung des Ammonsulfats; als typisches Beispiel darf folgender Versuchsausfall gelten:

Serum	Wasser	3,6 Proz. Citratlösung	Abgeschiedene Eiweißmenge des Serums bei $(NH_4)_2SO_4$ Halbsättigung g-Proz.
0,5	2,5	—	4,20
0,5	2,0	0,5	4,20
0,5	1,0	1,5	3,72
0,5	—	2,5	3,48

Der Vergleich der Fällungswirkung des Ammonsulfats in Plasmaserum und zugehörigem recalcifizierten Citratserum zeigt gute Übereinstimmung:

Versuchsreihe 3. In 22 Parallelbestimmungen einer Serie kam eine mittlere Abweichung der $(NH_4)_2SO_4$-Ganzsättigungsfraktionen von 0,21 g-Proz. zur Beobachtung.

Aus diesen Befunden darf der Schluß gezogen werden, daß der Zusatz von Natriumcitrat und Calciumchlorid in den verwendeten Konzentrationen die Fällungsgrenzen des Ammonsulfats nicht verschiebt und daher die Bestimmung der $(NH_4)_2SO_4$-Fraktionen im Salzplasma berechtigterweise zur Durchführung kommen darf.

III. Methodik.

Die Methodik gestaltet sich demgemäß folgendermaßen: Nach Füllung der Hämatokrit-Zentrifugierröhrchen mit 3,6proz. Citrat-

lösung bis zur untersten und Blut bis zur obersten Marke[1]) wird durch mehrmaliges Wenden der Röhrchen bei Gummiabschluß der Inhalt gemischt, in hochtouriger Zentrifuge bis zur Plättchenfreiheit des Plasmas und Volumenkonstanz des Sediments zentrifugiert, darauf der Abstand der oberen Sedimentgrenze von der mittleren Marke in Millimetern (*c*) gemessen, das Plasma möglichst vollständig in jeweils gemessener Menge (*m* ccm) abgehoben und mit 0,3 ccm (bei 5-ccm-Röhrchen: 0,6 ccm) 1,28proz. Calciumchloridlösung vermischt; das geronnene Eiweiß wird nach beendeter Koagulation entfernt, mit Wasser, Alkohol, Äther gewaschen, im Wägegläschen getrocknet und auf der analytischen Wage gewogen; vom übrigbleibenden recalcifizierten Citratserum wird 1 ccm mit 2 ccm Wasser und 3 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, nach einigen Stunden klarzentrifugiert, darauf die überstehende Flüssigkeit in gemessener Menge (*n* ccm) abgehoben und ebenso wie 0,5 ccm des Gesamtserums nach Zufügung von n/25 Essigsäure in gleicher Menge im Wasserbad koaguliert; das ausgefällte Eiweiß wird auf vorgewogenen Filtern gesammelt, bis zur negativen Bariumsulfatreaktion gespült, mit Alkohol-Äther nachgewaschen, getrocknet und auf der Torsionswage gewogen.

Die technischen Einzelheiten finden sich in den früher erwähnten Mitteilungen bei der Schilderung der Verarbeitung der nativen Substrate.

Die Berechnung wird in folgender Weise durchgeführt: Wenn *a* die Entfernung der Bodenfläche von der mittleren Marke, *b* die Entfernung der mittleren Marke von der obersten Marke des jeweils verwendeten Röhrchens in Millimetern, *gfE* das gerinnungsfähige Eiweiß, *SGE* das Serumgesamteiweiß, *AGF* das Eiweiß der $(NH_4)_2SO_4$-Ganzsättigungsfraktion in den jeweils festgestellten Gewichtsmengen bedeuten, ergibt sich:

$$\frac{gfE\ .\ 100}{m} \cdot \frac{c+b}{c} = \text{gerinnungsfähiges Eiweiß in g-Proz.;}$$

$$\frac{SGE\ .\ 100}{0{,}5} \cdot \frac{c+b}{c} \cdot \frac{m+0{,}3\,^{2)}}{m} = \text{Serumgesamteiweiß in g-Proz.;}$$

$$AGF\ .\ 100 \cdot \frac{c+b}{c} \cdot \frac{m+0{,}3^{2)}}{m} \cdot \frac{6}{n} = (NH_4)_2SO_4\text{-Ganzsättigungsfraktion in g-Proz.}$$

Die $(NH_4)_2SO_4$-Halbsättigungsfraktion in Grammprozenten berechnet sich aus der Differenz zwischen Serumgesamteiweiß und $(NH_4)_2SO_4$-Ganzsättigungsfraktion.

Das Verhältnis des flüssigen Blutanteils zum zellulären berechnet sich aus $\frac{c\ .\ 100}{a}$ = flüssiger Blutanteil in Prozenten des Vollblutes.

---

[1]) Bei (empfehlenswerten) Doppelbestimmungen werden an Stelle der 2,5-ccm-Röhrchen solche von 5 ccm Fassung verwendet.

[2]) Bzw. 0,6 bei Verwendung von 5-ccm-Röhrchen.

Kritik der Methoden.

Auf das Resultat der Vergleichsbestimmung der gerinnungsfähigen Eiweißkörper im Salzplasma braucht hier nicht mehr eingegangen zu werden (l. c.).

Die vergleichende Bestimmung des Gesamtserumeiweißes und des Eiweißes der $(NH_4)_2SO_4$-Ganzsättigungsfraktion ergibt gute Übereinstimmung.

Versuchsreihe 4. In 32 Parallelbestimmungen einer Serie kam zwischen den festgestellten Konzentrationen des Gesamtserumeiweißes eine mittlere Abweichung von 0,22 g-Proz., zwischen den Eiweißmengen der $(NH_4)_2SO_4$-Ganzsättigungsfraktionen eine solche von 0,14 g-Proz. zur Beobachtung.

Ein Beitrag zur Kenntnis der Katalasewirkung bei autotrophen Pflanzen.

Von

Mihovil Gračanin.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut
des Herrn Prof. Dr. *Bohumil Němec* in Prag.)

(Eingegangen am 4. Dezember 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die Katalaseaktivität während der Keimung der Samen einiger Kulturpflanzen.

Es ist wohl bekannt, daß in den Pflanzensamen eine ganze Reihe von Enzymen eingelagert ist, die auch während des scheinbaren Ruhezustandes der Samen — der Anabiose — unaufhörlich arbeiten. Der Same atmet nämlich ununterbrochen, und dazu ist eine dauernde Enzymtätigkeit erforderlich. Sobald günstige Bedingungen für die zur Keimung der Samen unentbehrlichen formalen Faktoren (Temperatur, Feuchtigkeit usw.) vorhanden sind, und wenn den inneren Faktoren (Ruhezeit usw.) Genüge getan wurde, so beginnt der Same zu erwachen. Es tritt nun eine intensivere Enzymtätigkeit ein, welche den Abbau der zusammengesetzten Moleküle der Reservestoffe bedingt, die sich im Samen entweder in schwer löslicher, oder in kolloidaler Form vorfinden. Durch die Gruppe der hydrolytischen Enzyme werden im Samen die zusammengesetzten Moleküle der Kohlenhydrate, Fette und Eiweißstoffe durch Wasseraufnahme zu einfachen, transportfähigen Verbindungen abgespalten, durch die Gruppe der Oxydations- und Reduktionsenzyme werden die verschiedenen Oxydations- und Reduktionsprozesse bewirkt, die synthetischen Enzyme wiederum leiten die verschiedenen Synthesen der zusammengesetzten Moleküle aus den einfachen Verbindungen ein usw. Jedem Enzym kommt eine ganz spezifische physiologische Rolle zu, und eine Störung in der Tätigkeit irgend eines Enzyms hätte sicherlich eine Störung des ganzen Keimungsprozesses der Samen zur Folge.

Die Keimung der Samen ist durch eine harmonische Tätigkeit der Enzyme bedingt. Es ist wahrscheinlich, daß die Tätigkeit der Enzyme während der Keimung der Samen in einer bestimmten Reihenfolge stattfindet, doch ist dieselbe bis jetzt noch nicht ermittelt. Es ist jedoch anzunehmen, daß im Laufe der Keimung eine bestimmte Gruppe von Enzymen das Übergewicht erlangt und auf eine bestimmte Gruppe von Reservestoffen einwirkt; hierauf verstärkt eine andere Gruppe, die vielleicht durch die Reaktion des von der vorhergehenden Enzymgruppe geschaffenen Mediums aktiviert ist, ihre Tätigkeit usw. *Die Tätigkeit eines jeden Enzyms während der Keimung der Samen läßt sich mittels einer Kurve darstellen, deren Verlauf für das betreffende Enzym charakteristisch ist.*

Das Studium der Enzymtätigkeit während der einzelnen Keimungstage der Samen gibt uns ein Bild von dem zeitlichen Verlauf der Tätigkeit der Enzyme und so können wir mittels der graphischen Darstellung der Enzymtätigkeitskurven während der Samenkeimung einen Überblick über den ganzen Verlauf der enzymatischen Prozesse im keimenden Samen gewinnen.

Vergleicht man die Enzymtätigkeitskurven mit den Kurven der bekannten Lebensprozesse (Atmung usw.), so läßt sich ein Zusammenhang zwischen den beiden feststellen.

Die erste Reihe der hier angeführten Versuche zeigt den Verlauf der Katalasetätigkeit während der Keimung der Samen einiger Kulturpflanzen, sie beleuchtet also bloß ein Glied der Kette der enzymatischen Prozesse im Verlauf der Samenkeimung.

Methodik.

Die Samen von Pisum sativum, Avena sativa, Hordeum vulgare, Zea mays, Sinapis alba und Pisum arvense wurden entweder in feuchte Sägespäne (Zea mays) oder in Petrischalen auf mit 15 ccm Wasser befeuchtetem Filtrierpapier eingesetzt und in einem Thermostaten, in dem eine ungefähr konstante Temperatur herrschte, zur Keimung gebracht. Jede Reihe der Versuche dauerte 6 Tage. Jeden Tag wurde eine bestimmte Menge von gekeimten Samen entnommen, die dann zur Bestimmung der Katalasetätigkeit diente. Die Samen wurden in Wasser ausgewaschen, um sie von den Sägespänen oder dem Filtrierpapier zu befreien, dann mit einem trockenen Filtrierpapier abgetrocknet und hierauf in einem Trockenapparat bei einer konstanten Temperatur von 40° C getrocknet. Hierauf wurde die Katalaseaktivität der Samen mittels des *Duchoň*schen (1) Katalasometers (Abb. 1) volumetrisch bestimmt.

Man nimmt 2 g durch ein 0,5-mm-Sieb gesiebtes Mehl der gekeimten Samen und schüttet dasselbe durch die Öffnung „*O*“ in den Kolben „*A*“ und gibt 20 ccm destilliertes Wasser dazu. Die Öffnung wird mit einem gut schließenden Gummistopfen verschlossen. Der Inhalt des Kolbens

wird vorsichtig geschüttelt, um so die entstandenen Mehlkügelchen zu beseitigen. Der Kolben *A* wird durch eine Umdrehung des Hahnes „*K*" verschlossen. Nun bringt man in den Zylinder „*N*" 15 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyd, das man durch Verdünnung von *Mercks* Perhydrol 1 : 9 hergestellt hat. Der Zylinder wird mit dem Ansatz „*u*" gut verschlossen und auf der anderen Seite mittels eines zweimal gebogenen Glasröhrchens in die Wanne mit Wasser getaucht und in das Eudiometer „*E*", der mit Wasser oder noch besser mit n/10 NaOH gefüllt ist, eingeführt. Nachher läßt man das im Zylinder enthaltene 3proz. Wasserstoffsuperoxyd zerfließen und schüttelt vorsichtig einigemal mit dem Apparate. Die Abspaltung des Sauerstoffs aus dem Wasserstoffsuperoxyd durch die Mehlkatalase kann nun im Eudiometer verfolgt werden.

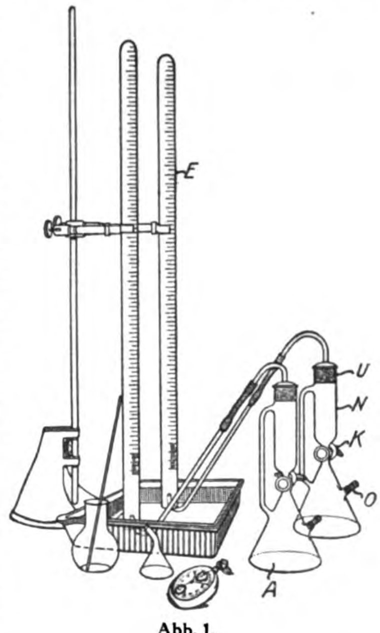


Abb. 1.

Die Messungszeit bei diesen Versuchen betrug 18 Minuten. Ich will noch betonen, daß das Samenmaterial immer aus derselben Saat entnommen wurde, und zwar wurden nur unverletzte Samen zur Keimung verwendet. Das Samenmehl wurde stets durch dasselbe Sieb gesiebt, da die Größe der Teilchen bei der volumetrischen Methode von großem Einfluß auf die Höhe der relativen Werte der Katalaseaktivität der Samen ist, denn es handelt sich um eine größere oder geringere Berührungsfläche des Samenmehls (eben der Katalase) mit Wasserstoffsuperoxyd.

1. Versuch mit Pisum sativum. Tabelle I veranschaulicht, wie sich die Katalaseaktivität in den ersten 6 Tagen der Keimung der Samen von Pisum sativum änderte. In der Tabelle sind die relativen Werte der Katalaseaktivität angeführt, nämlich die von 2 g Samenmehl aus 15 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyds in 18 Minuten abgespaltene Menge Sauerstoff. Weiter finden wir in der Tabelle die Angabe der Temperatur während der Keimung der Samen als auch während der Bestimmung der Katalaseaktivität.

Tabelle I.

Tag der Keimung	Die von 2g Samenmehl aus 15 ccm 3 proz. H_2O_2 in 18 Minuten abgespaltene Menge Sauerstoff in ccm	Durchschnittstemperatur während der Keimung der Samen in ^{0}C	Die Temperatur während der Bestimmung der Katalaseaktivität
vor der Keimung	28,8	—	17,0
1	25,4	18,5	17,0
2	29,6	18,0	17,0
3	35,6	18,0	17,0
4	49,0	18,5	17,5
5	60,8	18,0	17,5
6	45,8	18,0	17,0

Aus Tabelle I und besonders aus Abb. 1 ist ersichtlich, daß die Katalaseaktivität am ersten Tage der Keimung der Samen von Pisum sativum etwas geschwächt ist, dann aber steigt bis zum fünften Tage, an welchem sie ihr Maximum erreicht. Hierauf fällt sie wiederum ab.

2. Versuch mit Avena sativa. Die Änderungen der Katalaseaktivität während der einzelnen Keimungstage von Avena sativa ersieht man aus nachstehenden Daten, welche die an den einzelnen Keimungstagen von 2 g Samenmehl aus 15 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyd in 18 Minuten abgespaltene Menge Sauerstoff angeben.

Vor der Keimung = 18,2 ccm, erster Keimungstag = 30,8 ccm; zweiter Keimungstag = 41,6 ccm; dritter Keimungstag = 51,6 ccm; vierter Keimungstag = 85,8 ccm; fünfter Keimungstag = 90,2 ccm; sechster Keimungstag = 79,4 ccm.

Man sieht, daß bei Avena sativa die Katalaseaktivität am ersten Tage der Keimung der Samen nicht sinkt, sondern im Gegenteil ohne Unterlaß bis zum fünften Tage steigt, worauf sie dann wiederum abfällt.

3. Versuch mit Hordeum vulgare. Einen ähnlichen Verlauf der Katalaseaktivität wie bei Avena sativa finden wir auch während der Keimung der Samen von Hordeum vulgare, wie aus nachstehenden Zahlen zu ersehen ist: Vor der Keimung = 20,4 ccm; erster Keimungstag = 27,2 ccm; zweiter Keimungstag = 36,0 ccm; dritter Keimungstag = 45,6 ccm; vierter Keimungstag = 65,8 ccm; fünfter Keimungstag = 75,0 ccm; sechster Keimungstag = 68,2 ccm.

Es steigt demnach die Katalaseaktivität schon am ersten Tage der Keimung und erreicht ihr Maximum am fünften Tage.

4. Versuch mit Zea mays. Die Katalaseaktivität bei der Keimung der Samen von Zea mays ändert sich während der einzelnen Keimungstage in analoger Weise wie bei der Keimung von Avena sativa und Hordeum vulgare. Es wurde Sauerstoff abgespalten: Vor der Keimung = 50,0 ccm; erster Keimungstag = 54,2 ccm; zweiter Keimungstag = 68,6 ccm; dritter Keimungstag = 84,0 ccm; vierter Keimungstag = 90,2 ccm; fünfter Keimungstag = 93,8 ccm; sechster Keimungstag = 80,4 ccm.

Wir sehen, daß die Katalaseaktivität ihr Maximum am fünften Tage erreicht.

5. Versuch mit Sinapis alba. Von 2 g Samenmehl wurden aus 15 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyd nachstehende Mengen Sauerstoff abgespalten: Vor der Keimung = 11,4 ccm; erster Keimungstag = 6,0 ccm; zweiter Keimungstag = 23,2 ccm; dritter Keimungstag = 44,8 ccm; vierter Keimungstag = 36,2 ccm; fünfter Keimungstag = 23,4 ccm; sechster Keimungstag = 19,4 ccm.

Aus diesen Daten ist ersichtlich, daß der Verlauf der Katalaseaktivität während der Keimung der Samen von Sinapis alba eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Verlaufe der Katalaseaktivität bei Pisum sativum aufweist. Am ersten Tage der Keimung sinkt die Katalaseaktivität — wie bei Pisum sativum — hierauf steigt sie und erreicht bereits am dritten Tage ihr Maximum. Dann fällt sie wieder langsam ab.

6. Versuch mit Pisum arvense. Von 2 g Samenmehl wurden aus 15 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyd in 18 Minuten nachstehende Mengen Sauerstoff abgespalten: Vor der Keimung = 55,2 ccm; am ersten Keimungstag = 58,6 ccm; zweiter Keimungstag = 69,8 ccm; dritter Keimungstag = 85,8 ccm; vierter Keimungstag = 92,0 ccm; fünfter Keimungstag = 80,2 ccm; sechster Keimungstag = 70,0 ccm.

Schon am ersten Tage ist eine Steigerung der Katalaseaktivität zu beobachten. Das Maximum wird am vierten Tage erreicht, hierauf fällt die Katalaseaktivität wieder rasch ab.

Abb. 2 zeigt uns den Verlauf der Katalaseaktivität während der ersten sechs Tage der Keimung der Samen von Pisum sativum und Sinapis alba. Abb. 3 veranschaulicht die Veränderung der Katalaseaktivität während der Keimung der Samen von Avena sativa, Hordeum vulgare, Zea mays und Pisum arvense.

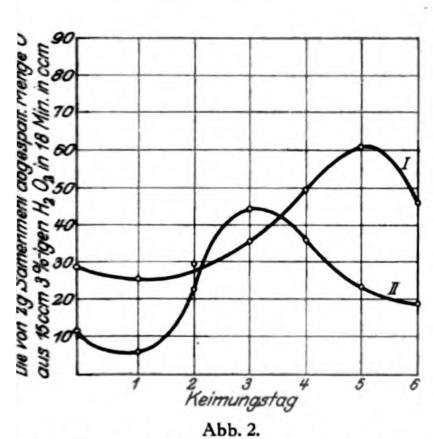


Abb. 2.
Die Katalasetätigkeit während der Keimung der Samen von I. Pisum sativum, II. Sinapis alba.

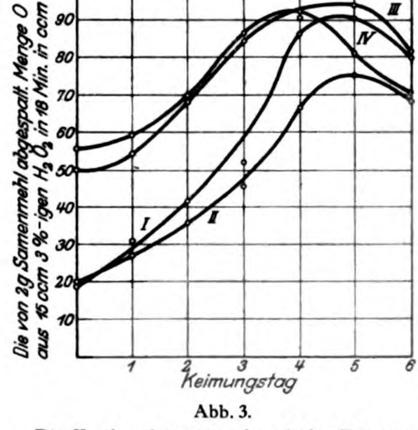


Abb. 3.
Die Katalaseaktivität während der Keimung der Samen von I. Avena sativa, II. Hordeum vulgare, III. Zea mays, IV. Pisum arvense.

Wir sehen, daß die Kurven der Katalaseaktivität während der Keimung der Samen der angeführten Kulturpflanzen beinahe insgesamt analog verlaufen. Die maximale Katalaseaktivität erreichen fast alle keimenden Samen am vierten oder am fünften Tage, nur bei Sinapis alba wird das Maximum schon am dritten Tage erreicht.

Es muß hervorgehoben werden, daß die hier angeführten Werte der Katalaseaktivität nur für die hier gegebenen Werte der Vegetationsfaktoren während der Keimung gelten, also hauptsächlich für die gegebene Temperatur, Belichtung, Feuchtigkeit usw. Von der Intensität dieser Faktoren hängt es ab, ob das Maximum der Katalaseaktivität früher oder später erreicht wird. Je günstiger die für die Keimung der Samen nötigen Bedingungen sind, desto schneller verläuft die Keimung, und desto früher erreicht die Katalaseaktivitätskurve ihr Maximum. Aus diesem Grunde wurde die während der einzelnen Keimungstage herrschende Temperatur angeführt.

Die Höhe der erhaltenen Werte ist auch von der Temperatur der Luft während der Bestimmung der Katalaseaktivität abhängig, weshalb auch diese bei allen Versuchen angegeben wurde.

Der Grund des Sinkens der Katalaseaktivität am ersten Tage ber Keimung der Samen von Pisum sativum und Sinapis alba ist nicht dekannt. Man kann nur annehmen, daß diese Herabsetzung der Katalaseaktivität entweder durch die während der Keimung der Samen zeitweilig frei werdenden Säuren bewirkt wird, oder daß durch andere, bei der Zersetzung der Reservestoffe der Samen entstehende Zwischenprodukte die Katalaseaktivität zeitweise inaktiviert wird.

Aus vorstehenden Diagrammen sieht man, daß die Katalaseaktivitätskurven der keimenden Samen von Avena sativa, Hordeum vulgare, Zea mays und Pisum arvense mit den Atmungskurven dieser Pflanzen ziemlich analog sind. Doch ist dies keineswegs bei Pisum sativum und Sinapis alba der Fall. — *Fernandez* (2) hat nämlich in neuester Zeit ausführliche Studien über die Atmung der Samen von Pisum sativum gemacht und festgestellt, daß bei einer durchschnittlichen Tagestemperatur von 20° C eine Steigerung der Atmung bis zum dritten Tage stattfindet. Diese Erkenntnis spricht für die Tatsache, daß die Katalaseaktivität und die Atmung während der Keimung der Samen nicht in einem direkten Zusammenhang stehen. Einigen Autoren aber gelang es, eine Beziehung zwischen diesen beiden Prozessen zu konstatieren. So hat *Sherman Hope* (3) bei Amaranthus einen parallelen Verlauf der Atmung und der Katalaseaktivität festgestellt, obwohl die Oscillationen der beiden Prozesse nicht parallel sind. Bei Crategus hingegen konnte er keinerlei Beziehung zwischen diesen beiden Prozessen nachweisen.

Die Versuche von *L. Rhine* (4) zeigten ein vollkommenes Verschwinden der Katalaseaktivität bei unter Wasser keimenden Samen, also bei der intramolekularen Atmung. Gleichzeitig verloren die Samen ihre Keimfähigkeit. Bei der normalen Atmung dient die Katalase wahrscheinlich zur Beseitigung gewisser Atmungsprodukte (H_2O_2), und dabei wird sie verbraucht. Die angesammelten Produkte der normalen Atmung führen zur Verstärkung der Katalaseregeneration. Bei steigender Atmung während der Keimung wird zuerst die Reservekatalase angegriffen, später aber wieder regeneriert. Unter Wasser sinkt die Atmung der Samen und die Regeneration der Katalase entfällt.

Ob wirklich eine direkte Beziehung zwischen der Intensität der Katalaseaktivität und der Atmung der keimenden Samen existiert, muß noch durch exakte Versuche nachgewiesen werden. Die hier angeführten Versuche zeigen bloß den Verlauf der Katalaseaktivität während der Keimung der Samen, und daß der Katalaseaktivität eine Funktion zukommt, deren Intensität während der Keimung sich durch eine bei fast allen geprüften Pflanzen analoge Kurve darstellen läßt. In letzter Zeit haben *A. Bach* und *A. Oparin* (5) gefunden, daß

die Katalase bei keimendem Weizen ihren Maximalwert am dritten bis vierten Tage erreicht, bei keimenden Sonnenblumensamen erreicht sie ihr Maximum am sechsten bis siebenten Tage der Keimung.

Über die Einlagerung der Katalase in der Samentesta und in den übrigen Samenteilen sowie über die Verteilung und Akkumulation der Katalase in den einzelnen Organen während der Entwicklung der Pflanzen.

Auf das verschiedenartige Vorkommen der Katalase in den Samen der verschiedenen Pflanzenfamilien sowie in den verschiedenen Gattungen derselben Familien haben schon die Arbeiten von *F. Duchoň* (1) aufmerksam gemacht.

Selbst in verschiedenen Teilen der Pflanzenorgane wurde eine ungleichartige Verbreitung der Katalase nachgewiesen. So hat schon *Staněk* (6) in seiner Arbeit über die Topographie der Katalase in der Zuckerrübenwurzel darauf hingewiesen, daß die Katalase in allen Teilen in der Richtung zum Kopfe und zur Oberfläche zu zunimmt, daß die größte Menge an Katalase sich an der Spitze und in den Korkschichten der Zuckerrübe vorfindet. Die geringste Katalasemenge enthält das Innere der Knolle. *Wendler* und *Lewin* (7) stellten weiter fest, daß bei den Cerealien der Katalasegehalt in der Richtung zur Oberfläche des Samens steigt. Außer diesen Arbeiten findet man in der Literatur keinerlei Angaben über die Verteilung der Katalase in den einzelnen Organen oder in den einzelnen Teilen der Pflanzen.

Es steht fest, daß die Intensität der Tätigkeit der Enzyme in den verschiedenen Organen je nach deren physiologischer Funktion verschieden ist. Die Erhöhung der Lebenstätigkeit eines bestimmten Organs ist an die erhöhte Tätigkeit einer bestimmten Gruppe seiner Enzyme gebunden. Deswegen konnte man vermuten, daß auch die Katalase — deren verschiedene Aktivität während der Keimung der Samen schon in früheren Arbeiten konstatiert wurde — in den neugebildeten Organen je nach der Intensität der Lebenstätigkeit derselben eine verschiedene Aktivität aufweisen wird. Dies wurde auch durch Versuche tatsächlich bestätigt.

Während der Entwicklung der Pflanze verläßt die Katalase ihren Standort und setzt sich verschieden in Wurzeln, Stengeln, Blättern an, wo sie in verschiedener Weise ihre Tätigkeit äußert. Dieses spezifisch ungleichmäßige Festsetzen der Katalase in den einzelnen Pflanzenorganen spricht dafür, daß ihre Anwesenheit in diesen oder jenen Organen nicht bedeutungslos ist, und daß sich in diesen Organen physiologische Prozesse abspielen, welche eine erhöhte Tätigkeit der Katalase verlangen. Darum war es die Aufgabe des ersten Teiles dieser Arbeit, die verschiedene Verteilung der Katalase in der Samentesta und in den übrigen Samenteilen festzustellen. Im zweiten Teil wollen wir die Akkumulation und die Verteilung der Katalase in den einzelnen Organen während der Entwicklung der Pflanzen verfolgen.

1. *Die Beziehung zwischen dem Katalasegehalt der Testa und dem übrigen Samenteil einiger Kulturpflanzen.*

Die Methodik der ersten Reihe dieser Versuche war sehr einfach. Die Samen von Pisum sativum, Lupinus angustifolius, Zea mays, Sinapis alba und Citrus nobilis wurden in Petrischalen auf angefeuchtetes Filtrierpapier gebracht und in einem Thermostaten bei einer Temperatur von 14° C 24 Stunden aufbewahrt, um durch Quellung der Samen die Abschälung der Testa zu erleichtern. Das Material wurde dann bei einer konstanten Temperatur von 40° C im Thermostaten getrocknet, zermahlen, gesiebt und die Katalaseaktivität mittels des *Duchoň*schen Katalasometers bestimmt.

Die Versuche haben gezeigt, daß die Testa aller geprüften Pflanzen bedeutend geringere Mengen an Katalase aufweist als die übrigen Samenteile. Die Katalase findet sich vorwiegend im Endosperm und im Embryo der geprüften monokotylen Pflanze Zea mays vor und in den Kotyledonen und im Embryo der geprüften dikotylen Pflanzen, wie aus Tabelle I ersichtlich ist.

Versuchspflanzen		Die von 1 g Samenmehl aus 15 ccm 3 proz. H_2O_2 in 5 Minuten abgespaltene Menge Sauerstoff in ccm	Die Temperatur während der Bestimmung der Katalasetätigkeit in °C
Pisum sativum	Testa	4,2	15,0
	Same ohne Testa	18,4	
Lupinus angustfiolius	Testa	4,4	20,0
	Same ohne Testa	110,4	
Zea mays	Testa	4,6	18,0
	Same ohne Testa	96,8	
Sinapis alba	Testa	1,4	16,0
	Same ohne Testa	6,0	
Citrus nobilis	Testa	5,8*)	15,0
	Same ohne Testa	100,6*)	

*) Die hier angeführten Werte gelten für die Versuchszeit von 4 Minuten.

Aus diesen Ergebnissen im Zusammenhange mit den im ersten Teile angeführten Versuchen dieser Arbeit kann man schließen, daß die Katalase eine wichtige Rolle bei der Zersetzung und Transformation der im Samen eingelagerten Reservestoffe spielt, in weitaus geringerem Maße ist sie jedoch an der Zersetzung der Stoffe des mechanischen Gewebes beteiligt.

2. *Akkumulation der Katalase in den einzelnen Organen im Laufe der Entwicklung der Pflanzen.*

Im vorhergehenden wurde darauf hingewiesen, daß die Katalaseaktivität während der Keimung der Samen einiger Kulturpflanzen erst steigt, nach 3 bis 5 Tagen ihr Maximum erreicht, worauf sie wieder abfällt. Die weitere Aufgabe ist die Bestimmung der Katalaseaktivität in den einzelnen Organen der jungen Pflanzen, also in Kotyledonen, Wurzeln, Stengeln und Blättern.

Methodik. Die Samen von Pisum sativum und Pisum arvense wurden in feuchten Sägespänen im Glashaus zur Keimung gebracht, wo eine annähernd konstante Temperatur herrschte. Die mittlere Tagestemperatur wurde stets als Durchschnitt der Temperatur am Morgen (8 Uhr), am Nach-

mittag (2 Uhr) und am Abend (6 Uhr) bestimmt, damit beiläufig bekannt ist, wie sich die Intensität dieses wichtigen Faktors — der Wärme — im Laufe der Keimung äußerte. Während der Entwicklung der Pflanzen wurden durch 12 Tage hindurch täglich einzelne gekeimte Samen bzw. die jungen Pflänzchen entnommen und vom ersten Tage an die Katalaseaktivität in den Kotyledonen, vom vierten Tage an die Katalaseaktivität der Wurzeln, und vom fünften Tage an die Katalaseaktivität der Stengel und Blätter bestimmt. Die Vorbereitung des Materials und die Bestimmung der Katalasemenge wurde wie bei den früheren Versuchen vorgenommen. Da das Material an verschiedenen Tagen verarbeitet wurde, also bei verschiedener Temperatur und verschiedenem Drucke, mußten die gewonnenen Werte auf den Druck von 760 mm Hg und 0° C umgerechnet werden. Die Temperatur der Luft während der Bestimmung der Katalaseaktivität war an allen Tagen annähernd dieselbe. Die so erzielten Werte wurden stets graphisch dargestellt.

Nach Beendigung eines Teiles dieser Versuche erhielt ich die noch unveröffentlichte Arbeit von *J. Válek*, die schon im Jahre 1922 im physiologischen Institut vom Prof. Dr. *B. Němec* ausgeführt wurde und in welcher derselbe Versuch mit Pisum sativum beschrieben war, der die von mir ausgeführten Versuche bestätigt. Ich will hier die Versuche von *J. Válek* anführen, welche beweisen, daß mit zunehmendem Alter des keimenden Erbsenpflänzchens der Katalasegehalt in den Kotyledonen am ersten Tage sinkt, dann bedeutend steigt, worauf er nach einer bestimmten Zeit wieder abnimmt. Demgegenüber hat er festgestellt, daß in den Wurzelteilen der Katalasegehalt mit der Zeit während des ganzen Versuchs steigt, wenn auch nur allmählich, im Stengel dagegen nimmt er sehr rasch zu. Aus Tabelle II geht hervor, wie sich die Katalaseaktivität in den Kotyledonen, der Wurzel und des Stengels im Laufe der Keimung der Pflänzchen von Pisum sativum zeigte.

Diese Versuche bestätigen auch jene ursprüngliche Erscheinung, die im ersten Teile meiner Arbeit angeführt ist, daß nämlich bei der Erbse am ersten Tage der Keimung die Katalaseaktivität abnimmt. Die Versuche, die ich mit der Erbse ausgeführt habe, stimmen bis auf die absolute Höhe der Werte des abgespaltenen Sauerstoffs vollkommen mit den Versuchen von *Válek* überein. Zu den Versuchen wurde stets bloß 1 g Mehl der geprüften Samen bzw. der Pflanzenorgane verwendet, deshalb sind die hier erhaltenen Werte niedriger; doch die Unterschiede der Werte, die der

Tabelle II.

Keimungsstadien der Pflanzensamen		Die von 2 g Samenmehl 3 proz. H_2O_2 in 5 Minuten abgespaltene Menge Sauerstoff in ccm
Samen vor der Keimung		139,0
1. Tag der Keimung		91,0
4. Tag der Keimung	Kotyledonen	210,0
	Wurzel	22,0
10. Tag der Keimung	Kotyledonen	140,0
	Wurzel	28,0
	Stengel	57,0
13. Tag der Keimung	Kotyledonen	105,0
	Wurzel	31,0
	Stengel	82,0

Wirkung der Katalase von 1 g Mehl an den einzelnen Tagen der von *Válek* und mir ausgeführten Versuche entsprechen, waren offensichtlich auch durch die verschiedene Qualität des von uns benutzten Versuchsmaterials bedingt.

Aus nachstehender Tabelle III ist ersichtlich, wie sich die Intensität der Katalaseaktivität in den einzelnen Organen im Laufe der Entwicklung der Pflanzen erwies. Ebenso läßt sich auch aus Abb. 4 die Katalaseaktivität in den einzelnen Organen während der Entwicklung der Pflanzen verfolgen.

Tabelle III.

Die Entwicklungstadien der Organe der keimenden Samen		Die von 1 g Mehl aus 15 ccm 3 proz. H_2O_2 in 10 Min. abgespaltene Menge Sauerstoff in ccm	Durchschnittstemperatur während der Entwicklung der Pflanzen in ° C
Die Samen vor der Keimung (ohne Testa)		48,4	—
„ „ am 1. Tage der Keimung (ohne Testa)		45,0	14,5
„ „ „ 2. „ „ „ „ „		54,8	15,0
„ „ „ 3. „ „ „ „ „		68,4	14,0
Die jungen Pflänzchen am 4. Tage	Kotyledonen	83,6	15,5
	Wurzel	9,0	
Die jungen Pflänzchen am 5. Tage	Kotyledonen	93,0	
	Wurzel	11,2	16,5
	Stengel	10,2	
Die jungen Pflänzchen am 6. Tage	Kotyledonen	87,8	
	Wurzel	13,0	16,0
	Stengel	14,2	
7. Tag		—	16,0
8. Tag		—	17,0
9. Tag		—	15,5
Die Pflanzen am 10. Tage	Kotyledonen	60,5	
	Wurzel	14,0	16,5
	Stengel	24,0	
Die Pflanzen am 12. Tage	Kotyledonen	57,2	
	Wurzel	14,8	16,5
	Stengel	28,8	

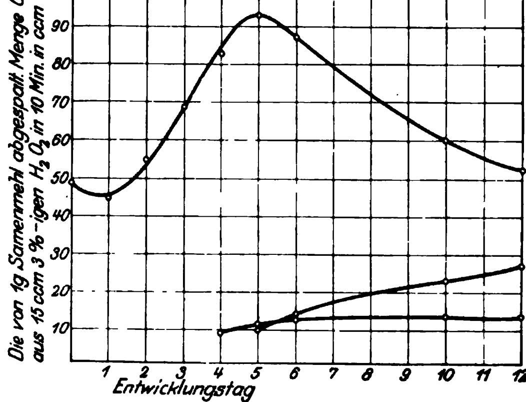


Abb. 4. Die Katalasetätigkeit während der Entwicklung der Pflanzen.
Pisum sativum: a in den Kotyledonen, b in den Stengeln und Blättern, c im Wurzelteil.

Aus Tabelle III und Abb. 4 ist ersichtlich, daß die Katalasetätigkeit in den Kotyledonen der Erbse am ersten Tage sinkt, dann rasch steigt bis zum fünften Tage, worauf sie ständig abnimmt, und zwar mit größerer Geschwindigkeit bis zum zehnten Tage, dann langsamer. Im Wurzelteile steigt der Katalasegehalt schon vom vierten Tage an (vom Beginn der Beobachtungszeit gerechnet), wenn auch sehr langsam, und erhält sich vom neunten Tage an auf beiläufig gleicher Höhe.

Vom fünften Tage an, an welchem mit der Messung der Katalaseaktivität im Stengel bzw. auch in den ersten Blättern begonnen wurde, konnte man eine rasche und ständige Steigerung der Katalaseaktivität feststellen. Die steigende Kurve der Katalaseaktivität im Stengel nähert sich der fallenden Kurve der Katalase in den Kotyledonen.

Die Kotyledonen erfüllen die Assimilationsfunktion nur während des Beginnes der Vegetation, d. h. also bis zur Ausbildung der ersten Blätter. Daher steigt in der ersten Zeit ihre Katalaseaktivität. Die Kotyledonen sterben bald ab und damit sinkt auch der Katalasegehalt, es entwickeln sich dauerhaftere, wirkliche Assimilationsorgane, die Blätter, und da sehen wir, daß die Katalase rasch in diesen aktiven Pflanzenorganen steigt.

Durch weitere Versuche mit Pisum arvense konnte man dieselbe Erscheinung feststellen, bezüglich der Akkumulation der Katalase im Laufe der Entwicklung dieser Pflanze, wie aus Tabelle IV und Abb. 5 ersichtlich ist.

Tabelle IV.

Die Entwicklungsstadien der Organe der keimenden Samen		Die von 1 g Mehl aus 15 ccm 3 proz. H_2O_2 in 10 Min. abgespaltene Menge Sauerstoff in ccm	Durchschnittstemperatur während der Entwicklung der Pflanzen in °C
Die Samen vor der Keimung (ohne Testa)		35,8	—
„ „ am 1. Tage der Keimung (ohne Testa)		37,2	16,5
„ „ „ 2. „ „ „ „ „		48,4	15,0
„ „ „ 3. „ „ „ „ „		62,6	16,0
Die jungen Pflänzchen am 4. Tage	Kotyledonen	74,8	16,5
	Wurzel	6,4	
Die jungen Pflänzchen am 5. Tage	Kotyledonen	71,2	17,5
	Wurzel	8,0	
	Stengel	7,8	
Die jungen Pflänzchen am 6. Tage	Kotyledonen	59,2	16,5
	Wurzel	9,0	
	Stengel	10,2	
7. Tag		—	17,0
8. Tag		—	17,5
9. Tag		—	17,0
Die Pflanzen am 10. Tage	Kotyledonen	36,8	17,0
	Wurzel	10,0	
	Stengel	14,2	
Die Pflanzen am 12. Tage	Kotyledonen	35,0	16,5
	Wurzel	10,2	
	Stengel	18,8	

Die Katalaseaktivität in den Kotyledonen von Pisum arvense steigt schon vom ersten Tage an, erreicht am vierten ihr Maximum, worauf sie sinkt, und zwar bis zum zehnten Tage ziemlich schnell, dann langsamer.

Im Wurzelteile steigt die Katalaseaktivität ununterbrochen bis zum siebenten Tage, worauf sie sich auf beiläufig der gleichen Höhe hält. Vom fünften Tage nimmt die Katalase in den Stengeln auffallend zu, so daß vor dem zwölften Tage die Kurve der Katalaseaktivität sich in der Richtung der abfallenden Kurve der Katalase der Kotyledonen nähert.

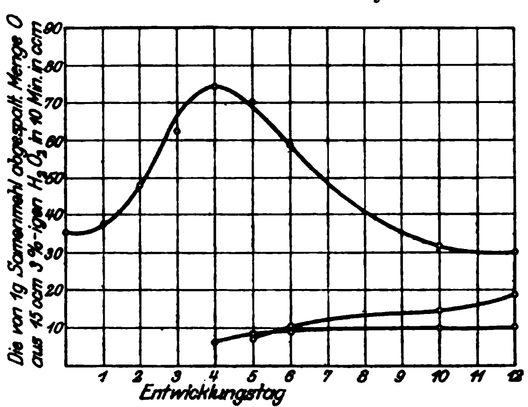


Abb. 5. Die Katalasetätigkeit während der Entwicklung der Pflanzen.
Pisum arvense: a in den Kotyledonen, b in den Stengeln und Blättern, c im Wurzelteil.

Endlich wurde festgestellt, in welchem Verhältnis bezüglich der Katalasemenge die einzelnen Organe der vollkommen entwickelten Pflanzen stehen. Schon frühere Versuche mit jungen Pflänzchen zeigten, daß sich die Katalase bei autotrophen Pflanzen hauptsächlich in den Stengeln und in den Blättern akkumuliert, weniger in den Wurzelteilen. Im Stengel steigt sie zu einer Zeit, zu welcher sie sich in der Wurzel auf beinahe gleicher Höhe hält und in den Kotyledonen abnimmt. Es ist dies ein Beweis dafür, daß sich die Katalase hauptsächlich in den sich entwickelnden Blättern anhäufen soll. Die mit vollkommen entwickelten Pflanzen ausgeführten Versuche zeigten dann tatsächlich, daß sich die Katalase nicht in den Stengeln, sondern hauptsächlich in den Blättern akkumuliert. Bei vollkommen entwickelten grünen Pflanzen zeigen auch die Wurzeln einen bedeutenden Katalasegehalt auf, wenn auch in geringerem Maße als die Blätter. In nachstehender Tabelle sind die Versuchsresultate angeführt, welche zeigen, wie die Katalase in den einzelnen Organen der vollkommen entwickelten Pflanzen, die im Sande gewachsen sind, verteilt ist.

Versuchspflanze		Die von 1 g Mehl aus 15 ccm 3 proz. H_2O_2 in 10 Minuten abgespaltene Menge Sauerstoff in ccm	Die Temperatur während der Bestimmung der Katalasetätigkeit in °C
Lupinus angustifolius	Blätter	35,8	19,0
	Stengel	9,2	
	Wurzel	22,0	
Medicago sativa	Blätter	30,2	18,0
	Stengel	9,4	
	Wurzel	33,4	
Zea mays	Blätter	7,6	18,0
	Stengel	2,0	
	Wurzel	4,6	

Wie aus den angeführten Resultaten zu ersehen ist, weisen die vollkommen entwickelten Pflanzen von Lupinus angustifolius, Medicago sativa und Zea mays im Stengel den geringsten Katalasegehalt auf. Bei allen drei geprüften Pflanzen steht der Katalasegehalt des Stengels beiläufig in gleichem Verhältnisse zum Katalasegehalt der Blätter.

Die Katalasemenge in den Wurzeln der Lupine und Kukuruz ist etwas geringer als der Katalasegehalt der Blätter, bei Medicago sativa wurde in der Wurzel ein größerer Katalasegehalt konstatiert als in den Blättern.

Aus diesen Versuchen sehen wir weiter, daß Zea mays, welches sowohl in den Blättern als in den Stengeln und Wurzeln reich an mechanischen Geweben ist, einen auffallend niedrigen Katalasegehalt aufweist, was mit den Resultaten der vorhergehenden Versuche übereinstimmt, laut welchen in der Samentesta die Katalase in minimalen Mengen vorhanden ist.

Zum Schluß des ersten und zweiten Teiles der hier angeführten Versuche ist noch hervorzuheben, daß sich der Autor vollkommen der Unzulänglichkeiten bewußt ist, welche bei dieser Art der Verfolgung der enzymatischen Tätigkeit in vitro aufkommen können. Trocknen wir nämlich das Material bei einer Temperatur von 40° C, so wird damit nicht vollständig jener Stand der Katalaseaktivität fixiert, wie er gerade an dem Tage der Keimung war. Durch die Versuche von *Euler* und *Borgenstamm* (8) wurde auch festgestellt, daß die Temperatur ein Faktor ist, der die Katalaseaktivität bedeutend erhöhen kann und daher sagen die Autoren: „Wir haben dann nämlich keine Garantie dafür, daß die von den frischen Zellen unter normalen Umständen geäußerte Katalasewirkung nicht schon von Aktivatoren oder sonst irgendwie in hohem und ganz unbekanntem Grade beeinflußt ist".

Diesen Mängeln kann man teilweise so abhelfen, daß die Trocknung des Materials regelmäßig, bei vollkommen gleicher Temperatur ausgeführt wird, so daß die erzielten Werte beiläufig in gleicher Weise von den objektiven Werten abweichen und so vergleichbar sind.

Zusammenfassung.

1. Die Versuche mit den Samen von Pisum sativum, Avena sativa, Hordeum vulgare, Zea mays, Pisum arvense und Sinapis alba haben gezeigt, daß im Laufe der Keimung der Samen die Aktivität der Katalase äußerst intensiv steigt und ihr Maximum spätestens am fünften Tage erreicht. Bei den Samen von Pisum sativum und Sinapis alba sinkt die Katalaseaktivität am ersten Tage, worauf sie wieder rasch zu steigen beginnt, während bei den anderen Versuchspflanzen die Katalaseaktivität schon am ersten Tage der Keimung der Samen steigt. Die Kurven der Katalaseaktivität im Laufe der Keimung der Samen sind beinahe insgesamt analog.

2. In den Samen der geprüften dikotyledonen Pflanzen Pisum sativum, Lupinus angustifolius, Sinapis alba und Citrus nobilis ist die Katalase hauptsächlich im Embryo und in den Kotyledonen eingelagert bzw. bei der monokotylen Zea mays im Endosperm und im Embryo. Die Testa aller geprüften Pflanzen wies in der Regel einen bloß unbedeutenden Katalasegehalt auf, woraus sich schließen läßt, daß der

Katalase eine bestimmte Funktion bei dem Abbau der zusammengesetzten Stoffmoleküle während der Keimung des Samens und der Entwicklung der Pflanzenorgane zukommt.

3. Durch das Studium der Katalaseaktivität in den Kotyledonen, Wurzeln und Stengeln bei der Keimung von Pisum sativum und Pisum arvense wurde festgestellt, daß dieselbe in den Kotlyedonen bis zum fünften Tage steigt, worauf sie abfällt. In den Wurzeln steigt die Katalasetätigkeit sofort, wenn auch in geringem Maße, und hält sich eine bestimmte Zeit hindurch in annähernd konstanter Höhe. In den Stengeln steigt der Katalasegehalt schon vom ersten Tage an, die Aktivitätskurve steigt rascher an als in der Wurzel, und nähert sich stets der abfallenden Kurve der Katalasetätigkeit in den Kotyledonen.

4. Die Versuche mit den vollkommen entwickelten Pflanzen Lupinus angustifolius, Medicago sativa und Zea mays haben tatsächlich gezeigt, daß die Akkumulation der Katalase hauptsächlich in den Blättern und Wurzeln lokalisiert ist, weitaus weniger in den Stengeln. Diese Erkenntnis beweist wiederum, daß die Katalase eine physiologische Funktion hauptsächlich in den Organen ausübt, deren Zellen eine erhöhte Lebenstätigkeit aufweisen.

Zum Schluß möchte ich noch Herrn Dr. *F. Duchoň* meinen aufrichtigsten Dank für seine freundlichen Ratschläge aussprechen.

Literatur.

1) *F. Duchoň*, Zemědělský-Archiv, Jahrg. 12, Nr. 9/10, S. 399. Prag 1921. — 2) *Fernandez*, ref. in Zeitschr. f. wiss. Bot. 1924, H. 6, S. 349. — 3) *Sherman Hope*, Bot. Gaz. 72, 1, 1920. — 4) *L. Rhine*, ebendaselbst 78, 46, 1924. — 5) *A. Bach* und *A. Oparin*, diese Zeitschr. 134, 183, 1922. — 6) *V. Staňek*, Zeitschr. f. Zuckerind. in Böhmen 31, 207, 1907. — 7) *Wender* und *Lewin*, zitiert in ebendaselbst 31, 207, 1907. — 8) *Euler* und *Borgenstamm*, diese Zeitschr. 1920, S. 124.

Abmessung des Blutes für Mikroanalysen ohne Torsionswage mittels einer Pipette.

Von

Z. Ernst und **St. Weiss.**

(Mitteilung aus der I. medizinischen Universitätsklinik in Budapest.)

(Eingegangen am 5. Dezember 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Eine der Hauptschwierigkeiten bei der Durchführung der Mikrobestimmungen im Blute besteht in der genauen Abmessung des zur Bestimmung benutzten Blutes. Bekanntlich hat *Bang* zu diesem Zwecke folgendes Verfahren benutzt. Das Blut wird durch einfache Berührung mit speziell zu diesem Zwecke verfertigten Filtrierpapierstreifen in diese eingesogen. Das Gewicht dieses Papierstreifens wird vor und nach der Blutentnahme mit der Torsionswage bestimmt; die Differenz (der beiden Wägungen) ergibt das Gewicht des Blutes. Nach 5 bis 6 Minuten Trocknen kommen die Papierstreifen in Eprouvetten, in welchen dann die Enteiweißung und die Extraktion der zu bestimmenden Bestandteile vorgenommen wird. Der so erhaltene Extrakt wird dann zur eigentlichen Zuckerbestimmung benutzt.

Das Arbeiten mit Torsionswage und Filtrierpapier hat neben vielen Vorteilen viele Nachteile. Die Torsionswage ist ein ziemlich kostspieliger Apparat, daher für kleine Laboratorien schwer zu beschaffen. Die richtige Durchführung der Mikrobestimmung des Blutzuckers sowie anderer Blutbestandteile ist an die Menge von etwa 100 mg Blut gebunden; auch bei großer Übung kommt es oft vor, daß durch das Filtrierpapier entweder zu wenig oder zu viel Blut aufgenommen wird. Im ersten Falle leidet die Genauigkeit der Bestimmung, im letzteren Falle ist die Extraktion unvollkommen, und es löst sich auch leicht Eiweiß vom Filtrierpapier los. Die Anwesenheit dieser minimalen Eiweißmengen führt bei den meisten Mikromethoden zu einem Fehler, wodurch die ganze Bestimmung wertlos wird. Eine einmal entnommene

zu geringe Blutmenge kann nicht nachträglich ergänzt werden, da das Blut während dieses Zeitverlustes durch Verdunstung bedeutend an Gewicht verliert. Selbst bei einmaliger Gewichtsbestimmung kommt das Verdunsten in Betracht, indem das Blut dadurch etwa 0,5 mg von seinem Gewicht verliert. Ein weiterer Nachteil der Torsionswage besteht darin, daß dieselbe nicht transportabel ist, so daß die Blutentnahme im Laboratorium vorgenommen werden muß, was nicht immer leicht durchzuführen ist. Zum Aufsaugen des Blutes ist nur eine speziell zu diesem Zwecke verfertigte Filtrierpapiersorte geeignet, da sich der Eiweißniederschlag von einem anderen Papier leicht loslöst und in den Extrakt gelangt. Dadurch aber wird die Bestimmung, wie schon gesagt, gestört. Schließlich verlängert die Filtrierpapiermethode die Bestimmungszeit dadurch, daß die Extraktion des Zuckers, Chlors usw. eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, die bei Chlor z. B. mindestens 6 Stunden ausmacht.

Alle diese Nachteile der *Bang*schen Mikrobestimmungen[1]) haben uns schon im Jahre 1919 zur Publikation einer Modifikation dieser Methoden veranlaßt, bei welcher das Abwiegen des Blutes volumetrisch mit einer zu diesem Zwecke konstruierten Kapillarpipette geschieht. Dadurch wird die Benutzung der Torsionswage und des Filtrierpapiers überflüssig. In den letzten 2 bis 3 Jahren wurden — da unser Verfahren anscheinend unbekannt blieb — mehrere ähnliche Versuche gemacht.

Pincussen[2]) beschrieb folgendes Verfahren: Man saugt aus der Fingerkuppe in eine 0,1 ccm fassende Pipette Blut und überträgt es aus der Pipette auf den *Bang*schen Filtrierpapierstreifen. Nach 5 Minuten Trocknenlassen wird der Papierstreifen mit der *Bang*schen Uranylacetat-Kaliumchlorid eiweißfällenden Lösung beschüttet. Das weitere Arbeiten geschieht nach dem *Bang*schen Originalverfahren. Bei dieser Art der Blutabmessung entsteht dadurch ein Fehler, daß etwas Blut an der Wand der Pipette haften bleibt. Die verbrauchte Blutmenge wird also nicht 0,1 ccm, sondern etwas weniger sein. Auch werden durch diese Methode die durch das Filtrierpapier verursachten Schwierigkeiten nicht eliminiert. *Landsberg*[3]) gelang es, durch die von ihm neuestens beschriebene Methode das Filtrierpapier auszuschalten.

Landsberg saugt das Blut in eine Melangeurpipette, deren Kapillarrohr bei 0,02, 0,04, 0,1 und 0,2 ccm markiert ist. Nachher verdünnt er das Blut auf 2 ccm mit destilliertem Wasser, wodurch die Blutgerinnung verhindert wird. Das verdünnte Blut bläst er in eine Eprouvette und wäscht das an der Pipettenwand klebende Blut mit 2 ccm Wasser nach. Die Enteiweißung geschieht durch Kochen und nachher mit kolloidalem Eisenhydroxyd nach *Rona-Michaelis*. Dann folgt das Auffüllen mit destilliertem Wasser und das Filtrieren. Zur Zuckerbestimmung werden aliquote Teile des

[1]) *Bang*, Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile.
[2]) *Pincussen*, Mikromethodik.
[3]) *Landsberg*, Klin. Wochenschr. 1923.

Filtrats verwendet. Abgesehen davon, daß bei dieser Methode die Enteiweißung etwas umständlich ist, ist sie auch deswegen nicht entsprechend, weil sie ungenaue Werte gibt; wahrscheinlich deswegen, weil die *Bang*sche Methode nur beim Gebrauch der hierfür vorgeschriebenen Lösungen exakte Resultate ergibt. Da *Landsberg* zur Enteiweißung nicht die *Bang*sche KCl-Uranylacetatlösung gebraucht, so fehlt im Reaktionsmedium die KCl-Menge, die zum normalen Verlauf der Reaktion notwendig ist. Es ist aber bekannt, daß dieselbe Zuckermenge je nach der Zusammensetzung des Reaktionsmediums verschiedene Kupfermengen reduziert. Nach unseren Untersuchungen ergibt die *Landsberg*sche Methode um 20 bis 25 Proz. niedrigere Blutzuckerwerte als die *Bang*sche.

Wenn wir auch also die Blutaufsaugung und Enteiweißung nicht mit der Torsionswage bzw. Filtrierpapier machen, so muß trotzdem die Bestimmung des Zuckers genau mit den durch *Bang* vorgeschriebenen Reagenzien geschehen, denn nur so können wir richtige Werte bekommen. Dieser Forderung entspricht die schon erwähnte Methode[1]), die wir seither so modifiziert haben, daß sie eine genauere Abmessung des Blutes als mit der Torsionswage gestattet.

Die Aufsaugung und die Enteiweißung des Blutes geschieht folgenderweise. In einem kleinen Kolben ist mit Hilfe eines einmal durchbohrten Korkes ein Kapillarrohr befestigt. Der Durchmesser des Kapillarrohrs ist 1 mm, sein freies Ende ist spitzig geschliffen (nicht ausgezogen, denn durch das Schleifen verengt sich das Lumen des Kapillarrohrs nicht, durch Ausziehen aber ja). Das Lumen des Kapillarrohrs erweitert sich an einer Stelle, und oberhalb der Erweiterung ist es mit einer Marke versehen.

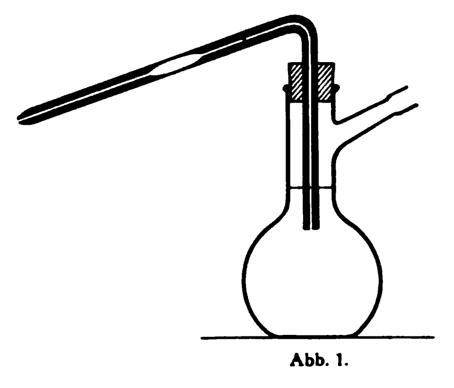


Abb. 1.

Die Länge der Kapillare beträgt von der Spitze bis zur Marke zweckmäßig etwa 6,5 cm, von da bis zur Biegung etwa 3 cm; ihr Inhalt von der Spitze bis zur Marke 0,115 cm. Auch der Hals des Kolbens ist mit einer Marke versehen; sein Inhalt beträgt bis zur Marke genau 15 cm. Oberhalb der Marke ist ein Seitenrohr an dem Kolben angebracht, der mit Gummiröhrchen und Glasmundstück montiert ist (fehlt auf der Zeichnung).

Es ist gut, wenn der Kolben einen breiten Boden hat, und dadurch wird der Apparat stabiler.

Die Abmessung sowie die Enteiweißung des Blutes geschieht mit diesem Apparat folgendermaßen:

Mit Hilfe des Mundstücks am Seitenrohr wird aus der *Fingerbeere* Blut bis zur Marke in die Kapillare gesogen.

Jetzt wird die Kapillare von dem außen haftenden Blute gereinigt und das Blut in den Kolben hineingesogen. Sofort danach wird durch die

[1]) *Ernst* und *Weiss*, Wien. klin. Wochenschr. 1921.

Kapillare *Bang*sche Lösung zur Enteiweißung in den Kolben gesogen, welche das Eiweiß sofort in Form eines reichlichen flockigen Niederschlags fällt. Das Hineinsaugen der fällenden Lösung geschieht am besten so, daß man abwechselnd etwas Luft und dann etwas Lösung durch die Kapillare einsaugt; auf diese Weise genügt nämlich viel weniger Lösung, um das Blut (rasch, quantitativ) in den Kolben zu waschen (so erreichen wir, daß das Blut quantitativ in den Kolben gespült wird). Dann entfernen wir die Kapillare samt Stöpsel. Sollte an dem dem Kolben zugekehrten Ende etwas Blut haften, so wird es mit der Enteiweißungsflüssigkeit in den Kolben gewaschen und der Kolben danach bis zur Marke damit gefüllt. Eventueller Schaum, der das genaue Auffüllen des Kolbens erschweren könnte, wird durch einen Tropfen reinen Äthers sofort beseitigt. Nach dem Auffüllen kann die Flüssigkeit sofort filtriert werden. Es soll dazu ein möglichst kleines Filter benutzt werden, damit das Filtrierpapier nicht viel Flüssigkeit zurückhalte (Diameter des geöffneten Filtrierpapiers 6 bis 7 cm). So erreichen wir, daß die Menge des Filtrats nicht weniger als 14 ccm betragen wird. Wir messen mit einer zu diesem Zwecke hergestellten Pipette mit *einer* Marke 13 ccm des Filtrats in einen Erlenmeyerkolben von 125 ccm Inhalt; und zwar darum 13 ccm, weil die *Bang*sche Zuckerbestimmung für diese Menge ausgearbeitet ist.

Das weitere Verfahren geschieht ganz nach der Vorschrift von *Bang* und *Hatlehoel*, indem wir zur Flüssigkeit im Erlenmeyerkolben Jodlösung zusetzen, dann mit Wasserdampf zum Sieden erhitzen usw. Auch die Berechnung geschieht in der Weise, wie sie im erwähnten Artikel angegeben ist. Die als Resultat der Bestimmung erhaltene Zuckermenge entspricht dem Zuckergehalt von 0,1 ccm Blut. Die Menge des in die Kapillare gesaugten Blutes beträgt nämlich, wie schon gesagt, 0,115 ccm. Diese Menge wurde auf 15 ccm aufgefüllt und von 13 ccm des Filtrats zur Bestimmung benutzt. Die Bestimmung geschah also in $^{13}/_{15}$ des aufgesaugten Blutes. Das macht aber 0,1 ccm aus. Das so erhaltene Resultat bezieht sich also auf Blutvolumen sowie überhaupt die meisten chemischen Analysen im Blute, im Gegensatz zum Verfahren von *Bang*, der den Gehalt an Blutzucker auf die Blutmenge bezieht.

Das Kalibrieren der Kapillare geschieht mit Quecksilber. Dem Volumen von 0,115 ccm entspricht bei Zimmertemperatur 1,563 g Quecksilber.

Das mitgeteilte Verfahren ersetzt also die teure Torsionswage und macht zugleich den Gebrauch von Filtrierpapier überflüssig. Der Apparat selbst ist sehr einfach und folglich billig, wodurch die *Bang*schen Mikromethoden *weiteren* Kreisen zugänglich werden. Die Bestimmungen sind mit diesem Apparat sehr schnell ausführbar, da die bei Gebrauch von Filtrierpapier notwendige Extraktionszeit wegfällt (Mikrozucker ½ Stunde, Mikrochlor 5 Stunden). Das Verfahren ist einfach, denn das Aufsaugen und das Enteiweißen des Blutes kann in demselben Apparat vorgenommen werden; eine Übertragung des verdünnten Blutes zwecks Enteiweißung in ein anderes Gefäß (Verfahren von *Landsberg*) wird dadurch hinfällig. Da das Blut vor Ausflockung des Eiweißes nicht mit destilliertem Wasser verdünnt wird, und die Enteiweißung mit *Bang*scher Lösung geschieht, so verläuft der chemische Prozeß genau so wie beim Verfahren von *Bang*. Da das Abmessen

des Blutes mit einer Pipette geschieht, die dort, wo abgelesen wird, ein kapillares Lumen besitzt, so ist die Abmessung mit einer großen Genauigkeit möglich, die jene beim Gebrauch einer Torsionswage erreichbare übertrifft.

Mit dem obigen Verfahren haben wir uns besonders eingehend an der Hand der Zuckerbestimmung befaßt. Natürlich ist es aber auch zum Gebrauch für andere Mikromethoden geeignet. So hat z. B. *Rusznyák* mit Benutzung dieses Verfahrens eine Mikromethode zur Chlorbestimmung ausgearbeitet.

Über den Mechanismus der Guajakreaktion.

Von

Edna Uys-Smith (B. A.).

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1925.)

Wir verdanken *M. W. Onslow* den Beweis, daß bei dem Zustandekommen der Guajakreaktion der Pflanzen Brenzcatechinderivate eine ausschlaggebende Rolle spielen[1]. Nach den Untersuchungen von *v. Szent-Györgyi*[2] ist der Mechanismus der Reaktion der folgende: Durch die Oxydase wird das Brenzcatechin zu einem o-Diketochinon oxydiert, das unmittelbar das Guajak unter Bildung der blauen Farbe oxydiert.

Onslow hat zugleich nachgewiesen, daß bei der Reaktion das natürliche Brenzcatechin durch p-Kresol ersetzt werden kann. *Onslow* erklärt dies durch die Annahme, daß das Kresol durch das Ferment zunächst zu einem Brenzcatechinderivat (3, 4-Dihydroxytoluen) oxydiert wird, und das Harz erst unter Mitwirkung dieses Brenzcatechinderivats gebläut wird. Später ist es *M. W. Onslow* und *M. E. Robinson*[3]) tatsächlich auch gelungen, in einer p-Kresollösung, auf die Oxydase eingewirkt hat, Brenzcatechin nachzuweisen (violette Farbe bei Zugabe von Ferrosalzen bei neutraler Reaktion; bei höherer Alkalität Umschlag in Purpur).

Die Mitteilung von *Onslow* und *Robinson* enthält wohl den Beweis, daß aus p-Kresol unter Einwirkung von Oxydase ein o-Dihydroxyderivat gebildet wird. Soweit aber aus der Mitteilung ersichtlich ist, ist durch diese Versuche noch nicht bewiesen, daß die Guajakreaktion tatsächlich dem entstandenen Brenzcatechinderivat zugeschrieben werden kann. Man könnte wohl auch denken, daß das Guajakharz unmittelbar durch ein aus dem Kresol entstandenes Chinon gebläut wird, und die geringe Menge des entstandenen Brenzcatechins bei der Reaktion noch keine wesentliche Rolle spielt.

---

1) *W. M. Onslow*, Biochem. Journ. **14**, 535, 1920.

2) *A. v. Szent-Györgyi*, diese Zeitschr. **162**, 399, 1925.

3) *W. M. Onslow* und *M. E. Robinson*, Biochem. Journ. **19**, 420, 1925.

Um hierüber Aufschluß zu erhalten, haben wir die Intensität der Guajakreaktion bei variierter Kresol- und Brenzcatechinkonzentration verglichen. Dann versuchten wir, die Menge des aus dem Kresol unter Fermenteinwirkung in derselben Zeit entstandenen Brenzcatechins zu ermitteln. Aus dem Ergebnis dieser Versuche konnten wir nun ableiten, ob die Menge des aus Kresol entstandenen Brenzcatechins tatsächlich ausreicht, um die erhaltene Guajakreaktion auch ohne Mitwirken des noch unveränderten Kresols zu erklären. Das Resultat war das folgende: *Die Menge des aus p-Kresol unter Einwirkung der Oxydase entstandenen Brenzcatechinderivats ist genügend, um die Guajakreaktion zu erklären.* Der Befund spricht also zugunsten der *Onslow*schen Annahme, daß das p-Kresol, bevor es sich an der Bläuung des Guajakharzes beteiligen kann, durch das Ferment zuerst zu einer o-Dioxyverbindung oxydiert werden muß.

Experimentelles.

Zu allen Versuchen wurde das a. a. O. beschriebene (Zitat 2, S. 403) Fermentpräparat benutzt. Die Versuche wurden in kleinen, 3 ccm fassenden Becherchen bei Zimmertemperatur ausgeführt. Stets wurden zu 1 ccm der entsprechenden Brenzcatechin- bzw. Kresollösung ein Spatelchen (30 mg) Ferment und ein Tropfen 10proz. Guajaktinktur gegeben. Als Lösungsmittel diente durchweg ein $\frac{0{,}5\text{ mol. Na-Acetat}}{0{,}05\text{ Essigsäure}}$-Puffer.

Wird in dieser Weise eine Verdünnungsreihe von Brenzcatechin mit dem Faktor 2 dargestellt, so zeigt sich nach 15 Minuten bei einer Brenzcatechinkonzentration von 0,006 Proz. eine sehr starke, bei 0,003 Proz. eine starke, bei 0,0015 Proz. eine mäßige und bei 0,00075 Proz. noch eine recht deutliche Guajakreaktion. Nach dem Herstellen der Mischungen erscheint die Reaktion sehr schnell. In 10 Minuten ist sie in 0,006 Proz. bereits stark, in 0,0015 Proz. bereits deutlich.

Bei Gebrauch von p-Kresol an Stelle des Brenzcatechins erscheint die Reaktion viel langsamer. In 15 Minuten ist die Reaktion bei 0,05 Proz. Kresol ebenso stark wie bei einer Brenzcatechinkonzentration von 0,006 bis 0,003 Proz. p-Kresol 0,025 Proz. = Brenzcatechin 0,003 bis 0,0015 Proz. p-Kresol 0,012 und 0,006 Proz. = Brenzcatechin 0,0015 bis 0,0007 Proz.

Nun wurden dieselben Verdünnungsreihen von p-Kresol mit Ferment, jedoch ohne Guajakharz hergestellt. Nach 15 Minuten wurde je ein Tropfen 1proz. Ferrosulfat und 0,6 ccm 5proz. $NaHCO_3$, dann ein kleiner Tropfen Ammoniak zugesetzt. Die Intensität der Farbe wurde verglichen mit der Intensität der Farbe einer Brenzcatechinreihe, die in analoger Weise mit Ferment, jedoch unmittelbar vor der Ferro-

reaktion frisch zubereitet wurde. Hierbei zeigte sich, daß die Ferroreaktion bei der Kresolkonzentration 0,05 und 0,025 Proz. gleich stark war wie die Ferroreaktion der Brenzcatechinreihe bei der Konzentration von 0,006 bis 0,003 Proz. Kresol 0,012 und 0,006 Proz. = Brenzcatechin 0,0015 Proz.

Die Intensität der Guajakreaktion ist also bei einer gegebenen Kresolkonzentration gleich stark wie die Intensität der Guajakreaktion einer reinen Brenzcatechinlösung, deren Konzentration übereinkommt mit der Konzentration des während des Versuchs aus dem Kresol gebildeten Brenzcatechins.

Über die Zusammensetzung des aus normalem Menschenharn mit p-Dimethylaminobenzaldehyd darstellbaren, kristallisierbaren Farbstoffs. I.

Von

Georg Scheff.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1925.)

Da es bislang nicht gelungen ist, die Methode, die *P. Hári*[1]) zur Darstellung des von ihm seinerzeit gefundenen Farbstoffs beschrieben hatte, im Sinne einer besseren Ausbeute zu modifizieren, mußten etwa 100 Liter Harn verarbeitet werden, um 1 g der rohen bzw. 0,70 g der wiederholt umkristallisierten Substanz zu erhalten. Letztere zeigte dieselben Eigenschaften, die *Hári* an den von ihm erhaltenen winzigen Mengen beschrieben hatte: Die blättrige Struktur der dunkel kupferroten Masse mit dem eigentümlichen Fett- oder Seidenglanz, die Leichtlöslichkeit in Äthylalkohol, Unlöslichkeit in Wasser usw., das Maximum der Lichtabsorption der alkoholischen Lösung bei 508 $\mu\mu$ (*Hári* 507,5 $\mu\mu$), das Absorptionsverhältnis (*Vierordt*) an dieser Stelle = 0,000 008 96 (*Hári* 0,000 008 80). Den Schmelzpunkt habe ich etwas höher gefunden, und zwar schmolz die Substanz in drei Versuchen scharf bei 228° C (bei *Hári* zwischen 215 und 225° C).

Im Besitz der oben bezeichneten Menge konnte nunmehr darangegangen werden, genauere Untersuchungen über etwaigen Halogen-, Schwefel- und Eisengehalt auszuführen bzw. den Nachweis zu führen, daß die bereits von Anfang her (als bloß minimale Mengen zur Verfügung gestanden hatten) gehegte Vermutung, daß die genannten Elemente fehlen, auch richtig sei.

Schwefel. Etwa 3 cg der Substanz wurden mit einem Überschuß von salpetersaurem und kohlensaurem Natrium (1 : 4) vermischt und in über einer Spiritusflamme geschmolzenes salpetersaures Natrium

---

[1]) Diese Zeitschr. 117, 41, 1921.

kleinweise eingetragen. Die erkaltete Schmelze habe ich in verdünnter Salzsäure gelöst, am Wasserbade eingedampft, wieder in Salzsäure gelöst, eingedampft usw. Zum Schlusse erwies sich die Lösung als sulfatfrei.

Chlor. Die Bestimmung nach *Carius*, in einem bestbekannten reichsdeutschen Laboratorium ausgeführt, ergab die Abwesenheit von Chlor.

Eisen. Nach der kolorimetrischen Methode von *Autenrieth* und *Funk*[1]) untersucht, erwiesen sich mehrere Präparate als eisenhaltig; doch waren es bloß so geringe Mengen, 0,025 bis 0,054 Proz., daß von vornherein vermutet werden durfte, daß es sich um Verunreinigungen handelt. Das war in der Tat der Fall, indem sich die Salzsäure, die zur Bereitung des *Ehrlich*schen Reagens verwendet wurde, als eisenhaltig, wenn auch in sehr geringem Grade, erwies. Nun wird aber nach der Vorschrift von *Hári* im Bleifiltrat des Harns, das sich durch Zusatz des Reagens tiefrot gefärbt hatte, die Säure durch Zusatz von Ammoniak abgestumpft; ja, oft ist es nötig, auch über die neutrale Reaktion hinaus noch Ammoniak hinzuzufügen. Dann ist es aber auch verständlich, daß Eisenhydroxyd, wenn auch in minimalen Mengen, neben dem flockigen Farbstoff ausfällt und ihm auch nach dem Umkristallisieren anhaftet. In der Tat konnte ich mich wiederholt davon überzeugen, daß bei Verwendung von eisenfreier Salzsäure der Eisengehalt des Farbstoffs auf ein auch kolorimetrisch nicht mehr zu bestimmendes Minimum absinkt.

Der Farbstoff ist also schwefel-, chlor- und praktisch auch eisenfrei.

---

[1]) *W. Autenrieth* und *Albert Funk*, Münch. med. Wochenschr. 59, 765, 1912.

Über die Zusammensetzung des aus normalem Menschenharn mit p-Dimethylaminobenzaldehyd darstellbaren, kristallisierbaren Farbstoffs. II.

Von

Paul Hári.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1925.)

Im Jahre 1921 habe ich[1]) einen kristallisierbaren Farbstoff beschrieben, der sich durch Kondensation mit p-Dimethylaminobenzaldehyd bei höherer Temperatur aus jedem normalen Menschenharn in geringen Mengen darstellen läßt, und der verschieden ist von dem roten Farbstoff der in manchen pathologischen Harnen auf Zusatz des erwähnten *Ehrlich*schen Reagens in der Kälte entsteht. Daß dem von mir dargestellten Farbstoff der Charakter einer chemisch reinen, einheitlichen Verbindung zukommt, ging mit großer Wahrscheinlichkeit einerseits aus dem recht konstanten Schmelzpunkt, andererseits aus der Konstanz der auf dieselbe Konzentration bezogenen Lichtabsorption hervor, indem das Absorptionsverhältnis (*Vierordt*) in der alkoholischen Lösung des Farbstoffs, an derselben Spektralstelle bestimmt, in jeder Lösung denselben Wert ergab.

Seitdem konnte, wie aus der vorangehenden Mitteilung von *G. Scheff*[2]) ersichtlich, festgestellt werden, daß die Substanz schwefel- und halogen- und praktisch auch eisenfrei ist.

Andererseits liegen nunmehr auch analytische Daten vor, die einen wahrscheinlichen Schluß auf die Art der Farbstoffkomponente gestatten, die, in normalem Menschenharn enthalten, sich mit dem Aldehyd zum Farbstoff kondensieren läßt. So hatte Herr Prof. *Hans Lieb* im Jahre 1921 die große Liebenswürdigkeit, wofür ihm an dieser Stelle bestens gedankt sei, die Mikroanalyse an einer eingesandten Probe auszuführen.

---

[1]) *P. Hári*, diese Zeitschr. **117**, 41, 1921.

[2]) *G. Scheff*, diese Zeitschr. **168**, 451, 1926.

Jahre später wurde in diesem Institut eine größere Menge der Substanz dargestellt und davon einem bestbekannten Laboratorium im Reiche zur Untersuchung eingesandt. Endlich hatte Herr Prof. *H. Fischer* in München, der die Substanz in seinem Institut herstellen ließ, die große Liebenswürdigkeit, für die ich ihm bestens danke, mir die Daten der Analysen zu überlassen, die er ausführen ließ. Diese Analysen ergaben folgendes:

Lieb. 3,910 mg Substanz lieferten 10,91 mg CO_2 und 2,16 mg H_2O; das sind 76,10 Proz. C und 6,18 Proz. H.

4,390 mg Substanz lieferten 12,28 mg CO_2 und 2,36 mg H_2O, das sind 76,29 Proz. C und 6,02 Proz. H.

4,609 mg Substanz lieferten bei 12° C und 735 mm Hg 0,422 ccm, das sind 10,60 Proz. N.

5,095 mg Substanz lieferten bei 17° C und 730 mm Hg 0,475 ccm, das sind 10,54 Proz. N.

4,135 mg Substanz lieferten bei 17° C und 739 mm Hg 0,382 ccm, das sind 10,58 Proz. N.

Privatlaboratorium. 20,165 mg Substanz lieferten 56,405 mg CO_2 und 11,510 mg H_2O, das sind 76,27 Proz. C und 6,34 Proz. H.

19,255 mg Substanz lieferten 53,800 mg CO_2 und 10,815 mg H_2O, das sind 76,18 Proz. C und 6,24 Proz. H.

6,905 mg Substanz lieferten bei 18° C und 720 mm Hg 0,665 ccm, das sind 10,47 Proz. N.

6,340 mg Substanz lieferten bei 18° C und 722 mm Hg 0,620 ccm, das sind 10,66 Proz. N.

Fischer. 3,820 mg Substanz lieferten 10,690 mg CO_2 und 2,190 mg H_2O, das sind 76,65 Proz. C und 6,44 Proz. H. Dabei waren auch 0,015 mg Asche, entsprechend 0,39 Proz. Asche zurückgeblieben.

4,208 g Substanz lieferten bei 17° C und 719 mm Hg 0,408 ccm, das sind 10,79 Proz. N.

Im Mittelwert der Analysen wurden also erhalten:

von *Lieb*	76,30 Proz. C,	6,10 Proz. H	und	10,57 Proz. N
vom *Privatlaboratorium*. .	76,23 „ C,	6,29 „ H	„	10,57 „ N
von *Fischer*	76,65 „ C,	6,44 „ H	„	10,79 „ N

Obzwar der von mir dargestellte Farbstoff mit dem Aldehydkondensationsprodukt des Urobilinogens in pathologischen Harnen durchaus nicht identisch ist, wie ich seinerzeit auszuführen Gelegenheit hatte und auch oben erwähnte, ist es durchaus wahrscheinlich, daß die Struktur der beiden Farbstoffe eine analoge ist. Nach den Ausführungen von *Fischer* und *Meyer-Betz*[1]) ist der „der *Ehrlich*schen Aldehydreaktion zugrunde liegende Farbstoff ein Dipyrrylmethanfarbstoff ...“, und in einer Korrespondenz mit Herrn Privatdozenten *Lieb* im Jahre 1921 vermutete ich dasselbe bezüglich meines Farbstoffs. Auf Grund

[1]) *Hans Fischer* und *Friedr. Meyer-Betz*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 75, 261, 1911.

der nunmehr vorliegenden Analysen und der Sicherheit, daß der Farbstoff einheitlicher Natur ist, ist es möglich, allerdings ohne daß es zunächst noch bewiesen werden könnte, daß wir es mit einem Kondensationsprodukt von 2 Molekülen Skatoxyl mit 1 Molekül des p-Dimethylaminobenzaldehyds zu tun haben.

Diese liefern nämlich unter Austritt von 1 Molekül Wasser die Verbindung $C_9H_8NO-C_9H_{11}N-C_9H_8NO = C_{27}H_{27}N_3O_2$, und ergibt die Berechnung für diese: C = 76,24 Proz., H = 6,35 Proz., N = 9,88 Proz., also vorzügliche Übereinstimmung des berechneten C- und H-Gehalts mit den von *Lieb* und im Privatlaboratorium erhaltenen Werten; während der N-Gehalt ein höherer ist.

Ob, wenn meine Annahme überhaupt richtig ist, das Skatoxyl als solches im Harne vorhanden ist, oder aber als Paarling erst durch Zusatz der (benzaldehydhaltigen) starken Säure zum kochenden Harnfiltrat (wie dies bei meiner Darstellungsart vorgeschrieben ist) abgespalten wird, bzw. ob das Skatoxyl erst unter Einwirkung der Säure aus einem anderen pyrrolhaltigen Harnbestandteil entsteht, muß zunächst noch dahingestellt bleiben. Hierüber werden erst spätere Versuche den Entscheid bringen können, denen allerdings die überaus geringe Ausbeute sehr hinderlich im Wege steht.

Über das Tartarylhämin von Stefan Hajdu.

Von

Helene Goldman.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1925.)

Vor kurzem hat *Stefan Hajdu*[1]) ein im obigen Institut von ihm dargestelltes Tartarylhämin beschrieben, in dem laut der mitgeteilten Analysenzahlen sehr wahrscheinlich 1 Molekül Weinsäure mit 4 Häminmolekülen verbunden ist. Für diese Zusammensetzung sprechen die C- und H-Werte einer auswärts ausgeführten Analyse, während die N- und Fe-Werte höher waren. Umgekehrt ergaben die von *Hajdu* selbst ausgeführten Analysen N- und Fe-Werte, die den berechneten weit näher kamen, während die C-Werte solche Schwankungen aufwiesen, daß sie als unbrauchbar bezeichnet werden mußten. Als Ursache letzterer Unstimmigkeiten wurde, nachdem *Hajdu* seine Versuche bereits abgebrochen hatte, ein Gebrechen des zur Elementaranalyse verwendeten Apparats konstatiert, das zu systematischen Fehlern führte. Nachdem dieses Gebrechen behoben war, habe ich auf Veranlassung von Prof. *Hári* an einem der von *Hajdu* dargestellten, im Institut verbliebenen Präparate folgende Analysen ausgeführt:

a) 0,0968 g Substanz ergaben 0,2315 g CO_2 und 0,041 g H_2O, und es sind 0,0129 g Fe_2O_3 verblieben. Die Berechnung ergibt **65,19 Proz.** C, 4,71 Proz. H und 9,32 Proz. Fe.

b) 0,0974 g Substanz ergaben 0,233 g CO_2, 0,0415 g H_2O, und es sind 0,0135 g Fe_2O_3 verblieben. Die Berechnung ergibt **65,24 Proz.** C, 4,73 Proz. H und 9,69 Proz. Fe.

Also erhielt ich angenähert soviel C wie der auswärtige Analytiker, und wie es auch dem theoretischen Wert entspricht, allerdings auch weniger H und mehr Fe als der Theorie entspricht.

---

[1]) *Stefan Hajdu*, diese Zeitschr. **168**, 233, 1925.

Fermente und Licht. VIII.

Von

Ludwig Pincussen.

Katalase. I.

Von

Franz Seligsohn.

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1925.)

Die katalytische Spaltung des Wasserstoffsuperoxyds durch Blut ist nach der herrschenden Anschauung bedingt durch zwei Komponenten: Einerseits durch die Katalase, welche ebenso wie aus den Blutkörperchen auch aus anderen Organen in einem gewissen Reinheitsgrad dargestellt werden kann und andererseits durch die Funktion des roten Blutfarbstoffs, augenscheinlich in einer gewissen Abhängigkeit vom Eisengehalt, da das eisenfreie Hämatoporphyrin unwirksam ist. Nach *Wu* (1) liegt aber das Optimum der Hämatinkatalase weit auf der alkalischen Seite im Gegensatz zum Katalaseoptimum, so daß bei den für die Katalase angewandten Wasserstoffzahlen der durch die Hämatinkatalase bedingte Fehler sehr gering ist und im allgemeinen höchstens 2 Proz. betragen dürfte.

Unter diesen Verhältnissen habe ich die nachfolgend geschilderten Versuche an der vom Blutfarbstoff nicht befreiten Katalase, d. h. also einfach verdünnten Blutlösungen angestellt. Die Versuche ähneln also in gewissem Maße denen an ungereinigten bzw. wenig gereinigten Fermenten, deren Resistenz gegenüber der Strahlung eine verhältnismäßig höhere ist als bei weiter gehender Reinigung, wie von *Pincussen* (2) gezeigt worden ist.

Über die Einwirkung der Strahlung auf Katalase liegen verhältnismäßig wenig Versuche vor. Nach *Waentig* und *Steche* (3) findet eine Herabsetzung der Wirksamkeit durch Bestrahlung statt, abhängig vom Grade der Reinheit; im alkalischen Medium ist die Wirkung am stärksten. Erwähnt seien auch noch Versuche von *Talarico* (4), daß auf Pferdeleberkatalase blaues Licht am stärksten wirkt, rotes und grünes jedoch unwirksam bleibt. Sauerstoff soll bei dieser Zerstörung nach *Agulhon* (5) nicht erforderlich sein, doch wird die Zerstörung durch Sauerstoff beschleunigt.

Es handelt sich nun darum, zu prüfen, ob bei der Strahleneinwirkung auf Katalase die gleichen Gesetzmäßigkeiten zu beobachten sind, wie sie in den früheren Mitteilungen für andere Fermente festgestellt wurden. Die Versuche gestalten sich, der außerordentlich schnellen Wirkungsabnahme der Blutkatalase entsprechend, verhältnismäßig schwierig, da die Ausführung des Versuchs in kurzer Zeit erfolgen muß. Als zweckmäßige Arbeitsmethode erwies sich die von *Bach* und *Levinger* (6) angegebene Modifikation. Die Entnahme des Blutes aus dem Tropfen (Fingerbeere des Menschen bzw. Ohrvene des Kaninchens) erfolgte mit einer 0,02 ccm fassenden Pipette; durch Ausblasen und mehrmaliges Auswaschen wurde der Inhalt in ein mit 50 ccm destillierten Wassers beschicktes Meßkölbchen quantitativ überführt. Bei der schon erwähnten schnellen Wirkungsabnahme der Blutkatalase war natürlich erforderlich, Versuchsproben und Kontrollen zu genau gleicher Zeit anzusetzen und ganz gleichmäßig zu behandeln. Zur Messung der katalatischen Kraft wurden in der Regel 5 ccm der so hergestellten Katalaselösung zu 100 ccm einer Perhydrollösung 1 : 2000 gefügt und die Mischung in ein Wasserbad von 18^0 gebracht. Sowohl vor Anfang des Versuchs wie dreimal innerhalb 20 Minuten wurden je 25 ccm der Reaktionslösung herausgenommen, durch Zugabe von 2 ccm 20proz. Schwefelsäure die Fermentwirkung unterbrochen und sodann mit n/100 Kaliumpermanganatlösung bis zum Auftreten einer 1 Minute lang bleibenden Rosafärbung titriert.

Die Bestrahlungen erfolgten mit dem Lichte einer Quarz-Quecksilberlampe, die bei einer Lampenspannung von 60 Volt mit 2 Amp. brannte. Die zu bestrahlenden Katalaselösungen befanden sich in Quarzgläsern, 10 cm von der Lichtquelle entfernt. Die Kontrolllösungen befanden sich, damit eventuelle Fehler durch Gase, besonders Ozon, ausgeschaltet waren, in gleichem Raume in gewöhnlichen Gläsern, gegen die Wirkung der Lampe geschützt. Die Bestrahlungsdauer schwankte zwischen 10 und 40 Minuten.

Über die Kinetik der Katalasespaltung besteht auch heute, trotz einer Reihe wertvoller Ergebnisse, noch kein abschließendes Urteil. Es scheint im wesentlichen, daß die Ansicht von *Morgulis* (7) zu Recht

besteht, nach dem die Kinetik von dem jeweiligen Mengenverhältnis Ferment : H_2O_2 abhängig ist. Wird bei überschüssiger Fermentmenge der größte Teil des Wasserstoffsuperoxyds zersetzt, so ist der Verlauf monomolekular; ist die Fermentmenge im Vergleich zum H_2O_2 verhältnismäßig gering, so verläuft die Spaltung nach dem bimolekularen Typ. Es scheint, daß auch Zwischenstufen möglich sind, wie z. B. von *Rona* und *Dambovic eanu* (8) bei der Leberkatalasespaltung unter gewissen Bedingungen gewonnene Resultate für eine 1½ molekulare Reaktion stimmen nach folgender Formel:

$$K_{1,5} = \frac{1}{t}\,\frac{\sqrt{a} - \sqrt{a - x}}{\sqrt{a(a - x)}}.$$

In den nachfolgenden Versuchen ist aus Raumersparnis darauf verzichtet, die Titrationswerte anzugeben; es sind sogleich die Geschwindigkeitskonstanten mitgeteilt, welche sich unter Annahme des monomolekularen Verlaufs ergeben. Es möge gleich erwähnt sein, daß diese Konstanten in einer Reihe von Fällen, zum Teil ziemlich erheblich, fallen, ohne daß die Berechnung nach einem anderen Reaktionstyp befriedigendere Werte ergeben hätte. Immerhin scheint es, daß hier der Typ der monomolekularen Reaktion nur bedingt gilt und daß wohl noch ein zweiter Faktor mitspricht, über den sich vorläufig nichts aussagen läßt.

Zunächst wurde in Bestätigung alter Befunde die Schädigung der Blutkatalase durch Quarzlicht gezeigt. Kaninchenblut: 0,02 ccm in 50 ccm Wasser aufgeschwemmt; ein Teil 30 Minuten stehengelassen, ein zweiter der Strahlung der Quarzlampe in 10 cm Abstand während 30 Minuten ausgesetzt. Es ergaben sich folgende Konstanten.

30 Minuten unbestrahlt		30 Minuten belichtet	
Nach 6 Minuten	0,0801	Nach 9 Minuten	0,0174
„ 15 „	0,0680	„ 16 „	0,0145
„ 20 „	0,0621	„ 20 „	0,0146

Wie in früheren Abhandlungen gezeigt worden ist, ist die Wirkung des Lichtes auf Fermente abhängig von der Verdünnung der bestrahlten Lösung. Ein entsprechender Versuch für Katalase wurde so angestellt, daß einmal 0,02 ccm Blut in 100 ccm Wasser, das andere Mal in 10 ccm Wasser aufgenommen wurden. Von diesen Verdünnungen, welche bestrahlt und unbestrahlt untersucht wurden, wurde eine dem gleichen Blutquantum entsprechende Menge, von der größeren Verdünnung also 10 ccm, von der geringeren Verdünnung 1 ccm auf die gleiche Menge H_2O_2-Lösung einwirken gelassen. Bestrahlung und sonstige Behandlung wie im vorigen Versuch.

30 Minuten unbestrahlt		30 Minuten bestrahlt	
a) 0,02 ccm Blut aufgenommen in 100 ccm Wasser. 10 ccm zum Versuch.			
Nach 5 Minuten	0,1512	Nach 6 Minuten	0,0023
„ 16 „	0,1216	„ 15 „	0,0015
„ 20 „	0,1128	„ 20 „	0,0014
b) 0,02 ccm Blut in 10 ccm Wasser : 1 ccm zum Versuch.			
Nach 6 Minuten	0,1060	Nach $6^1/_2$ Minuten	0,0232
„ 13 „	0,0929	„ 12 „	0,0225
„ 20 „	0,0896	„ 20 „	0,0201

Abgesehen davon, daß die unbelichtete, etwas stärker verdünnte Katalase stärker zu spalten scheint, ergibt sich auch für die Blutkatalase eine Bestätigung der Tatsache, daß verdünnte Lösungen einer Inaktivierung bzw. Schwächung durch das Licht in erheblich höherem Maße unterliegen als konzentriertere.

Ferner war zu untersuchen, ob die Reaktion einen Einfluß auf die Schädigung ausübt. Es ist hier zu bemerken, daß die Angaben über das Optimum der Katalasewirkung nicht ganz einheitlich sind; im ganzen scheint aber Einverständnis darüber zu herrschen, daß beim Neutralpunkt ungefähr die Wirkung der Katalase optimal ist. Die Versuche wurden mit Phosphatpuffern angestellt, und zwar wurden statt 50 ccm Wasser, in welche das Blut hineingeblasen wurde, Mischungen aus 45 ccm Wasser + 5 ccm m/3 Phosphat gewählt, so daß die ganze Lösung m/30 an Phosphat war. Im übrigen erfolgte weitere Behandlung in gleicher Weise, Bestrahlung ebenfalls wie in vorigen Versuchen angegeben. Die verwendeten p_H waren 6,24, 6,81, 7,35.

$p_H = 6{,}24$		$p_H = 6{,}81$		$p_H = 7{,}35$	
30 Minuten bestrahlt.					
Nach 6 Minuten	0,0375	Nach 6 Minuten	0,0307	Nach 7 Minuten	0,0469
„ 13 „	0,0390	„ 13 „	0,0315	„ 12 „	0,0478
„ 16 „	0,0368	„ 19 „	0,0297	„ 20 „	0,0473
30 Minuten unbestrahlt.					
Nach 6 Minuten	0,1422	Nach 5 Minuten	0,1643	Nach 7 Minuten	0,1405
„ 11 „	0,1406	„ 12 „	0,1364	„ 14 „	0,1314
„ 16 „	0,1415	„ 18 „	0,1376	„ 20 „	0,1363

Das Optimum liegt augenscheinlich bei p_H 6,81, wenn auch der Abfall nach beiden Seiten nicht sehr erheblich ist. Bei 6,81 ist auch die Wirkung der Katalase durch Licht am stärksten geschädigt, was auch den Erfahrungen bei den übrigen Fermenten entspricht. Nach den bisher gewonnenen Ergebnissen scheint es, daß man aus dem p_H, bei welchem die Strahlenschädigung am größten ist, direkt auf die optimale Wirksamkeit des Ferments schließen kann, daß man hier

also gewissermaßen eine Methodik in der Hand hat, das Optimum der Fermentwirkung zu kontrollieren.

Wie aus einer Reihe von Versuchen [vgl. besonders *Rona* und *Damboviceanu*, l. c. (8)] bekannt ist, wirken Salze schädigend auf die Katalasewirkung; insbesondere kommt dem Chlorion in dieser Beziehung erhebliche Wirksamkeit zu. Bei anderen Fermenten hatte sich ergeben, daß bei Salzzusatz die durch die Belichtung erzielte Schädigung geringer ist, und zwar wurde dies auf eine Vergröberung und darauf begründete schwerere Beeinflußbarkeit der kolloiden Fermentteilchen durch das Licht zurückgeführt. Auch nachstehender Versuch, der mit Menschenblut angestellt worden ist, zeigt, daß ein solcher, zum mindesten relativer Lichtschutz, durch Salz auch für die Katalase besteht. Es wurden 0,02 ccm Blut einerseits in 60 ccm Wasser, andererseits in 50 ccm Wasser + 10 ccm einer 1 proz. NaCl-Lösung aufgenommen. Von jeder Probe wurde die Hälfte 10 Minuten belichtet, die andere die gleiche Zeit unbelichtet stehengelassen. Behandlung im übrigen wie bei den vorigen Versuchen.

0,02 ccm Blut in 60 ccm H_2O		0,02 ccm Blut in 50 ccm H_2O + 10 ccm NaCl-Lösung	
10 Minuten bestrahlt.			
Nach 6 Minuten	0,0322	Nach 7 Minuten	0,0238
„ 11 „	0,0322	„ 13 „	0,0181
„ 22 „	0,0280	„ 20 „	0,0142
Unbestrahlt.			
Nach 4 Minuten	0,1269	Nach 6 Minuten	0,0495
„ 12 „	0,1025	„ $12^1/_2$ „	0,0415
„ 20 „	0,0932	„ 20 „	0,0335

Aus diesem Beispiel erhellt außer der starken Abschwächung der Fermentwirkung durch den Salzzusatz deutlich ein relativer Schutz gegenüber der Einwirkung der Strahlung, so daß bei den Kochsalzproben ungefähr 50 Proz. der Wirkung nach Bestrahlung erhalten bleibt, während ohne diesen Zusatz ungefähr 75 Proz. vernichtet werden. Die Wirksamkeit des Salzzusatzes ist also auch hier deutlich, obgleich durch das schädigende Halogenion die Verhältnisse zweifellos verwickelter werden.

Das gilt auch für die Versuche mit Kaliumjodid. Wie früher (9) gezeigt worden ist, wirkt Jod in statu nascendi, das durch Bestrahlung aus zugesetztem Jodkali frei gemacht wird, schädigend bis vernichtend auf die Wirksamkeit der Malzdiastase, während sowohl bei anderen Diastasen, ähnlich wie auch beim Pankreatin (10), sich eine erheblich kompliziertere Beeinflussung ergibt, augenscheinlich eine Resultante aus der schädigenden Wirkung des freigesetzten Jods und der

schützenden des Salzes. Die Dinge stellen sich sehr ähnlich beim Zusatz von Jodalkali zu Blutkatalaselösungen dar. Der hier mitgeteilte Versuch ist in genau gleicher Weise wie der vorher beschriebene angestellt. Blut ebenfalls von Menschen, 0,02 ccm einmal gemischt mit 60 ccm Wasser, das andere Mal mit 50 ccm Wasser + 10 ccm einer 1 proz. K J-Lösung, Belichtung 10 Minuten mit der stets angewandten Quarzlampe.

0,02 ccm Blut in 60 ccm H_2O		0,02 ccm Blut in 50 ccm H_2O + 10 ccm 1 proz. K J-Lösung	
	10 Minuten bestrahlt.		
Nach 5 Minuten	0,0247	Nach 5 Minuten	0,0193
„ 11 „	0,0261	„ 12 „	0,0198
„ 20 „	0,0198	„ 20 „	0,0155
	Unbestrahlt.		
Nach 6 Minuten	0,0858	Nach 5 Minuten	0,0713
„ 12 „	0,0814	„ 12 „	0,0591
„ 20 „	0,0795	„ 20 „	0,0388

Der relative Lichtschutz ist hier nicht so deutlich wie bei den Versuchen mit Kochsalz, was augenscheinlich daran liegt, daß mehrere Dinge zusammentreffen, die Wirkung des Salzes als solche, die Wirkung des Halogens mit ihrer Schädigung der Katalase und endlich die Wirkung des freigesetzten Jods. Immerhin ist ein gewisser Schutz besonders nach 20 Minuten Bestrahlung deutlich.

Daß Jod im statu nascendi, wenn die genannten komplizierenden Wirkungen fortfallen, eine starke Schädigung ausübt, ergeben Versuche mit dem Alival ($CH_2J . CHOH . CH_2OH$), das im Licht Jod abspaltet. Es wurde die Blutmischung mit und ohne Zusatz von 1 ccm Alival, bestrahlt und unbestrahlt, geprüft. Belichtung 15 Minuten.

0,02 ccm Blut in 50 ccm Wasser		0,02 ccm Blut in 49 ccm Wasser + 1 ccm Alival	
	Bestrahlt.		
Nach 7 Minuten	0,0212	Nach 5 Minuten	0,0059
„ 11 „	0,0205	„ 13 „	0,0057
„ 20 „	0,0192	„ 20 „	0,0046
	Unbestrahlt.		
Nach 5 Minuten	0,1349	Nach 5 Minuten	0,1474
„ 14 „	0,1286	„ 13 „	0,1107
„ 20 „	0,1305	„ 20 „	0,1057

Es ist zu bemerken, daß das Alival auch im Dunkeln eine gewisse Schädigung ausübt. Trotzdem ist die Schädigung im Lichte außerordentlich stärker ausgeprägt und drei- bis viermal so groß wie die ohne Jodzusatz.

Unter Zusatz von Phosphatpuffern ist die Wirkung des Alivals bzw. des in Freiheit gesetzten Jods zurückgedrängt, was augenscheinlich als reine Salzwirkung aufzufassen ist.

0,02 ccm Blut + 45 ccm H_2O + 5 ccm m/3 Phosphat p_H = 6,81 + 1 ccm Alival		0,02 ccm Blut + 45 ccm Wasser + 5 ccm m/3 Phosphat p_H = 7,35 + 1 ccm Alival	
15 Minuten bestrahlt.			
Nach 5 Minuten	0,0331	Nach 7 Minuten	0,0212
„ 13 „	0,0369	„ 12½ „	0,0215
„ 20 „	0,0363	„ 20 „	0,0202
Unbestrahlt.			
Nach 5 Minuten	0,1279	Nach 7 Minuten	0,1277
„ 13 „	0,1265	„ 12 „	0,1211
„ 20 „	0,1258	„ 20 „	0,1125

Aus den mitgeteilten Ergebnissen folgt, daß die Blutkatalase, in dem ungereinigten Zustande, in welchem sie zum Versuch kam, den gleichen Gesetzen gehorcht, wie sie von *Pincussen* und seinen Mitarbeitern bereits für andere Fermente aufgestellt worden sind. Die Wirkung der Strahlung ist um so intensiver, je verdünnter die Lösung ist, sie ist am stärksten im Punkte der optimalen Fermentwirkung; durch Salzzusatz zur Fermentlösung findet eine relative Minderung der Strahlenwirkung statt, infolge einer Vergröberung der für das Licht empfänglichen Kolloidteilchen. Durch im Licht abgespaltenes Jod wird die Fermentwirkung abgeschwächt; bei im Überschuß vorhandenem Salz kommt diese Schädigung jedoch nicht zur vollen Auswirkung.

Literatur.

1) *Wu*, Journ. of Biochem. 2, 195, 1923. — 2) *L. Pincussen*, Fermentforsch. 8, 182, 1925. — 3) *P. Waentig* und *O. Steche*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 76, 177, 1912. — 4) *G. Talarico*, Arch. Farmacol. 5, 81, 1910. — 5) *H. Agulhon*, Ann. Inst. Pasteur 26, 38, 1912. — 6) *E. Bach* und *W. Levinger*, Zeitschr. f. klin. Med. 25, 88, 1922. — 7) *S. Morgulis*, Journ. of biol. Chem. 47, 341, 1921. — 8) *P. Rona* und *A. Damboviceanu*, diese Zeitschr. 134, 20, 1922. — 9) *L. Pincussen*, ebendaselbst 152, 406, 1924. — 10) *L. Pincussen* und *Klissiunis*, ebendaselbst 152, 416, 1924.

Über Veränderungen des Fermentgehaltes des Blutes.

Von

Ludwig Pincussen.

II. Mitteilung:

Die Beeinflußbarkeit der Katalase.

Von

Franz Seligsohn.

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1925.)

Durch gelegentliche Befunde über Veränderungen im Katalasegehalt des Blutes bei Erregungszuständen des vegetativen Nervensystems wurde ich dazu geführt, die Abhängigkeit der Katalasemenge von Pharmacis, deren Einfluß auf das vegetative System bekannt ist, einer näheren Prüfung zu unterziehen. Es ergab sich hier eine gewisse Parallele zu der ersten Arbeit dieser Serie, in welcher der Beeinflußbarkeit der Nuclease und der Lipase durch Adrenalin und Pilocarpin nachgegangen wurde (1). Freilich liegen die Verhältnisse bezüglich der Katalase bisher noch besonders kompliziert in der Hinsicht, daß diese sich zwar einerseits im Blute, ferner in verschiedenen Organen findet, andererseits aber irgendwelche Beziehungen zwischen dem Fermentgehalt bzw. der Fermentproduktion der Organe und dem des Blutes bisher noch nicht aufgedeckt worden sind. Während man z. B. bei der Lipase, besonders auch auf Grundlage der eben genannten Arbeit annehmen muß, daß sie zum mindesten teilweise aus der inneren Sekretion der Organe stammt, ist die Katalase des Blutes nach allem, was bisher bekannt geworden ist, nur an die Formelemente des Blutes, in erster Linie an die roten Blutkörperchen gebunden und nur von ihnen, sowohl ihrer Zahl wie ihrer Zusammensetzung nach, abhängig. Daß zwei spaltende Einflüsse unter gewissen Umständen zusammenkommen, ein an das Gerüst der Körperchen gebundenes Ferment und ein Katalysator, der dem Blutfarbstoff sehr nahe steht, ist des ferneren

bekannt. Da letzterer aber seine Wirkung nur bei solchen Reaktionen in einigermaßen wesentlichem Umfange ausübt, die für biologische Fälle und auch für die angewandte Versuchsanordnung nicht in Betracht kommen, darf er, ohne einen Fehler zu begehen, vernachlässigt werden.

Die von mir angewandte Methodik ist in der Arbeit: Fermente und Licht, VIII, (2) genau geschildert, so daß darauf verwiesen werden kann. Es soll aber nochmals hervorgehoben werden, daß bei dem außerordentlich schnellen Abklingen der Katalasewirkung im Blute ein sehr schnelles Arbeiten notwendig ist, und daß vor allen Dingen die Zeiten zwischen Entnahme, Einbringen des Blutes in Wasser, Mischung mit der Wasserstoffsuperoxydlösung genau innegehalten werden müssen. Die erhaltenen Werte sind auch in dieser Arbeit sogleich nach der monomolekularen Reaktion berechnet und in den nachfolgenden Tabellen direkt die Geschwindigkeitskonstanten angegeben.

Als Versuchstiere dienten fast ausschließlich Kaninchen: ganz wenig Versuche sind am Menschen angestellt. Generell muß zuerst betont werden, daß zwischen den einzelnen Tieren erhebliche individuelle Unterschiede bestehen, und daß die unter Einwirkung der betreffenden Pharmaca erzielten Ausschläge unter sonst ganz gleichen Bedingungen ganz erheblich wechselten, ob es sich um junge kräftige, oder ältere, besonders wiederholt gebrauchte Tiere handelte. Resultate, die bei frischen Tieren ganz einwandfrei erschienen, wurden unter Umständen bei gebrauchten Tieren in das Gegenteil verkehrt. Es diente daher zur Regel, nur frische, kräftige Tiere zu benutzen und nach jedem Versuch mindestens eine Woche verstreichen zu lassen, bis mit demselben Tiere ein neuer Versuch angestellt wurde. Diese Erfahrung zeigt uns, wie lange ein solcher Eingriff noch nachwirken kann, ohne daß äußerlich oder im sonstigen Verhalten sich irgend etwas Besonderes gezeigt hätte. Wir haben hier gewissermaßen Analoga zu Resistenzerhöhungen, wie sie ja z. B. beim Morphin ganz geläufig sind, die aber doch viel weitere Kreise zu ziehen scheinen, als man gewöhnlich anzunehmen geneigt ist.

Die ersten Versuche beschäftigten sich mit dem Einfluß der auch in der ersten Mitteilung geprüften sympathischen bzw. parasympathischen Pharmaca, des Adrenalins und des Pilocarpins. Sie wurden in den üblichen Lösungen von 1 : 1000 bzw. 1 : 100 angewandt und den Tieren subkutan injiziert. Zur Anwendung gelangten 0,5 bzw. 1,0 ccm. Die Versuche wurden so angestellt, daß zunächst in einem Tropfen Blut die Katalase bestimmt wurde und daraufhin, kurze Zeit nachher, die Injektion der gewählten Menge Lösung erfolgte. 5 Minuten nach der Injektion wurde aus dem Ohre wiederum eine Blutprobe ent-

nommen; eine weitere Prüfung des Katalasegehaltes erfolgte eine Stunde nach der Injektion.

Die Ergebnisse waren die folgenden.

Injektion von 0,5 ccm Pilocarpin 1 : 100. Versuche an zwei verschiedenen Tieren.

	Vor Injektion		5 Minuten nach Injektion		1 Stunde nach Injektion	
a)	10 Minuten	0,0764	6 Minuten	0,0604	7 Minuten	0,0533
	15 „	0,0629	12 „	0,0514	15 „	0,0516
	20 „	0,0659	20 „	0,0457	20 „	0,0510
b)	12 „	0,0555	8 „	0,0589	9 „	0,0554
	18 „	0,0594	14 „	0,0552	18 „	0,0506
	20 „	0,0579	20 „	0,0488	20 „	0,0515

Die Wirkung dieser Dosis besteht also in dem einen Falle in einer leichten Schädigung, während im anderen Falle diese, besonders im Anfang, kaum in die Erscheinung tritt; einigermaßen deutlich ist der Effekt überhaupt nur beim ersten Versuch. In anderen Versuchen mit der gleichen Menge waren die Resultate ganz ähnlich, während eine sehr deutliche Veränderung sich dann ergab, wenn statt 0,5 ccm 1 ccm der Pilocarpinlösung injiziert wurde. Von den Versuchen seien wiederum zwei an verschiedenen Tieren angeführt.

	Vor Injektion		10 Minuten nach Injektion		1 Stunde nach Injektion	
a)	8 Minuten	0,0625	8 Minuten	0,0866	8 Minuten	0,0844
	13 „	0,0567	15 „	0,0816	17 „	0,0753
	20 „	0,0519	20 „	0,0804	20 „	0,0734
b)	8 „	0,0838	10 „	0,1230	8 „	0,1173
	16 „	0,0738	15 „	0,1058	16 „	0,1049
	20 „	0,0732	20 „	0,0991	20 „	0,0991

Es ergibt sich also ganz fraglos auf die Injektion der größeren Menge Pilocarpin eine erhebliche Beschleunigung der Geschwindigkeitskonstante, eine erheblich größere Spaltung, die bis 50 Proz. und mehr beträgt und in einer Stunde noch nicht abgeklungen ist. Wie ist diese stärkere Katalasewirkung zu deuten? Die bisherigen Befunde geben uns auf diese Frage keine Antwort. Eine Veränderung der roten Elemente kommt, wie Zählungen ergeben haben, nicht in Betracht. Die geringe Zunahme der weißen Blutkörperchen, welche ja ebenfalls in gewissen Mengen Katalase führen, gibt ebensowenig eine Erklärung für die so erhebliche Zunahme, um so mehr, als diese Leucocytose, die zuerst von *Horbaczewski* (3) beobachtet worden ist, besonders zu der Zahl der roten Blutkörperchen, nur ein verhältnismäßig geringes Ausmaß erreicht. Vor allen Dingen ist auffallend, daß bei der halben

injizierten Menge Pilocarpin fast das Gegenteil beobachtet wird. Wenn wir also der Leucocytose, die augenscheinlich sich auf dem Wege über die Milz auswirkt, eine Rolle zuerteilen wollen, so wird erforderlich sein, daß wir die katalatische Wirkung nicht lediglich auf die roten Zellelemente des Blutes beziehen, sondern daß wir auch eine irgendwelche Stoffwechselwirkung annehmen, die sich nun auch in der Katalasemenge dokumentiert. Wie wir uns den Mechanismus zu denken haben, läßt sich vorläufig nicht sagen. Wir werden aber zu der Anschauung gedrängt, daß sich auch andere katalasehaltige Stoffe unter der Pilocarpinwirkung in das Blut ergießen.

Wenn wir nun die Wirkung des Antagonisten, des Adrenalins, untersuchen, so ergibt sich ebenfalls ein verschiedenes Verhalten je nach der Menge des eingeführten Quantums. Injektion von 0,5 ccm einer Adrenalinlösung 1 : 1000 ergab wechselnde Resultate, in einigen Fällen eine klare Verschlechterung, in anderen eine leichte Besserung. Es tritt hier wie überhaupt die Individualität der Tiere stark hervor, indem augenscheinlich die zur Auslösung eines bestimmten Effektes notwendigen Mengen verschieden sind. An einem besonderen Beispiel wird das noch später gezeigt werden. Nachfolgend zwei Versuche mit 0,5 ccm.

	Vor Injektion		5 Minuten nach Injektion		1 Stunde nach Injektion	
a)	12 Minuten	0,0634	9 Minuten	0,0659	8 Minuten	0,0471
	16 „	0,0651	17 „	0,0601	17 „	0,0374
	20 „	0,0563	20 „	0,0566	20 „	0,0350
b)	8 „	0,0602	9 „	0,0619	7 „	0,0697
	17 „	0,0559	—	—	16 „	0,0540
	20 „	0,0486	20 „	0,0524	20 „	0,0511

Nach Injektion von 1 ccm erfolgte daher dagegen regelmäßig eine Schädigung, die meist mehr oder weniger schnell zurückging, die in anderen Fällen aber nach längerer Zeit sich stärker ausprägte als kurze Zeit nach der Injektion. Von beiden Verhältnissen hier je ein Beispiel.

	Vor Injektion		10 Minuten nach Injektion		1 Stunde nnch Injektion	
a)	10 Minuten	0,0798	10 Minuten	0,0606	11 Minuten	0,0514
	14 „	0,0705	15 „	0,0563	17 „	0,0451
	18 „	0,0639	18 „	0,0492	20 „	0,0424
b)	10 „	0,0667	9 „	0,0505	10 „	0,0667
	16 „	0,0633	15 „	0,0500	—	—
	20 „	0,0588	20 „	0,0462	20 „	0,0626

Auch diese Reaktion auf Adrenalin, die sich bei stärkeren Dosen regelmäßig in einer Schädigung auswirkt, findet in den bisher bekannten

Tatsachen keine Erklärung. Es wäre möglich, auch hier an eine Veränderung der Zahl der Zellen zu denken. Über die weißen Blutzellen besteht irgendwelche Einigkeit nicht [vgl. *Trendelenburg* (4)]. Was die roten Blutkörperchen betrifft, welche ja ganz allgemein für die Katalasewirkung im Blute verantwortlich gemacht werden, so besteht keinerlei Angabe darüber, daß eine Abnahme in Frage kommt; ganz im Gegenteil soll meistens eine Zunahme auftreten [Literatur bei 4)], die freilich nicht die Regel ist. Es läßt sich also die Abnahme der spaltenden Fähigkeit aus den Formelementen des Blutes nicht erklären. Es müssen also auch hier noch gewisse Mechanismen im Spiele sein, die uns vorläufig nicht näher bekannt sind. Einen Fingerzeig liefert vielleicht die Tatsache, daß unter subkutaner Adrenalininjektion die Verbrennungen im Organismus gesteigert werden, daß also gewissermaßen die Katalase, welche wohl dazu dient, überschüssiges Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen, bei solcher Steigerung der Verbrennungen nur in geringerem Maße erforderlich ist. Diese Hypothese ist freilich nur auf teleologischer Grundlage aufgebaut und erklärt uns noch nicht, auf welchem Wege die Anpassung der Katalasemenge an diese veränderten Vorgänge erfolgt. Jedenfalls scheinen sich hier Verbindungen zum allgemeinen Stoffwechsel hin zu ergeben.

Auffällig ist eine Abhängigkeit des Katalasewertes im Blute von der Ernährung. Während die Tiere im allgemeinen mit Rüben bzw. mit Kartoffeln ernährt wurden, wurde in einem Falle, bei einem Tiere, welches auf Adrenalin eine deutliche Abnahme der Katalasewirkung gegeben hatte, die Nahrung geändert und das Tier lediglich mit Hafer gefüttert. Nach 3 Tagen wurde 1 ccm Adrenalin in üblicher Weise injiziert und nunmehr folgende Werte erhalten.

Vor Injektion		10 Minuten nach Injektion		1 Stunde nach Injektion	
13 Minuten	0,0430	13 Minuten	0,0646	13 Minuten	0,0679
17 „	0,0380	17 „	0,0620	17 „	0,0620
20 „	0,0361	20 „	0,0617	20 „	0,0596

Die Reaktion ist also gerade umgekehrt wie sonst beobachtet, der Katalasegehalt fällt nicht ab, sondern steigt an. Das Verhältnis bleibt auch so, als die Haferfütterung noch einige Tage ausgedehnt wird, wenn auch nicht in gleichem Ausmaß. Es ist überhaupt eine wiederholt gemachte Erfahrung, daß nach Gewöhnung an eine bestimmte Kost die Verhältnisse sich weniger auffällig gestalten als kurz nach Nahrungswechsel: der Organismus scheint dann einfach zu seinen ursprünglichen Verhältnissen sich zurückzufinden. Es wurde hier beobachtet:

Vor Injektion			1 Stunde nach Injektion		
11	Minuten	0,0708	10	Minuten	0,0740
16	„	0,0704	16	„	0,0733
20	„	0,0637	20	„	0,0702

Bekanntlich unterscheiden sich Kartoffeln bzw. Rüben und Hafer vor allen Dingen in ihrem Verhältnis K : Ca, welches bei den ersteren verhältnismäßig hoch, beim Hafer mit seinem größeren Ca-Gehalt niedrig ist. Man wird wohl diesem Verhältnis eine Rolle bei der veränderten Reaktion einräumen müssen: wie die Wirkung ist, muß dahingestellt bleiben. Wenn auch nach den Lehren der *Kraus*schen Schule das Calcium mit dem Sympathicus, also auch der Adrenalinwirkung parallel zu setzen ist, so kennen wir doch genug Fälle, in denen es antagonistisch wirkt. Es soll daher von einer Hypothese abgesehen werden.

Eine Reihe weiterer Versuche beschäftigt sich mit der Frage, ob die Wirkung von Adrenalin durch Insulin aufgehoben wird oder ob eine Insulinwirkung eine Beeinflussung durch nachfolgende Injektion von Adrenalin erfährt. Die Versuchsanordnung war so, daß zunächst bei dem betreffenden Tiere die Katalase im Blute bestimmt wurde, darauf eine Injektion von Insulin erfolgte, eine Stunde später Blut entnommen und anschließend daran sofort eine subkutane Adrenalininjektion vorgenommen wurde. Die injizierte Insulinmenge betrug 3,5 bzw. 7 Einheiten (in 0,5 bzw. 1 ccm), die Adrenalinmengen waren 0,5 bzw. 1 ccm 1 : 1000.

In ganz ähnlicher Art, wie das in den vorher geschilderten Versuchen sich ergab, war auch hier eine gewisse Abhängigkeit von der angewendeten Dosis festzustellen. Zunächst ein Doppelversuch mit je 0,5 ccm der angewandten Lösung.

a)

Vor Injektion			1 Stunde nach Injektion von 0,5 ccm Insulin			1 Stunde nach Injektion von 0,5 ccm Adrenalin		
10	Minuten	0,0682	10	Minuten	0,0677	10	Minuten	0,0731
15	„	0,0577	15	„	0,0618	15	„	0,0645
20	„	0,0508	20	„	0,0551	20	„	0,0621

b)

Vor Injektion			1 Stunde nach Injektion von 0,5 ccm Adrenalin			1 Stunde nach Injektion von 0,5 ccm Insulin		
10	Minuten	0,0552	10	Minuten	0,0582	10	Minuten	0,0625
15	„	0,0476	15	„	0,0499	15	„	0,0549
20	„	0,0421	20	„	0,0424	20	„	0,0505

Es ergibt sich also der seltsame Zustand, daß von einem Antagonismus hier keine Rede sein kann; im Gegenteil wird sowohl durch Adrenalin eine bereits durch Insulin gesetzte Wirksamkeitserhöhung vermehrt, wie durch Insulin eine durch Adrenalin erzeugte. Die Ausschläge sind nicht sehr groß, jedoch deutlich einsinnig gerichtet.

Die Verhältnisse verändern sich, wenn die angewandten Mengen größer sind, wenn 1 ccm Insulin = 7 Einheiten bzw. 1 ccm der Adrenalinlösung injiziert wurden.

a)

Vor Injektion		1 Stunde nach Injektion von 1 ccm Insulinlösung		1 Stunde nach Injektion von 1 ccm Adrenalinlösung	
10 Minuten	0,0507	10 Minuten	0,0452	10 Minuten	0,0525
15 „	0,0488	15 „	0,0411	15 „	0,0479
20 „	0,0481	20 „	0,0417	20 „	0,0455

b)

Vor Injektion		1 Stunde nach Injektion von 1 ccm Adrenalin		1 Stunde nach Injektion von 1 ccm Insulin	
10 Minuten	0,0400	10 Minuten	0,0345	10 Minuten	0,0283
15 „	0,0360	15 „	0,0322	15 „	0,0255
20 „	0,0332	20 „	0,0280	—	—

a)

Vor Injektion		1 Stunde nach Injektion von 1 ccm Insulin		75 Minuten nach Injektion von 1 ccm Adrenalin	
10 Minuten	0,0529	11 Minuten	0,0347	10 Minuten	0,0423
15 „	0,0464	15 „	0,0330	16 „	0,0386
20 „	0,0322	20 „	0,0293	20 „	0,0356

b)

Vor Injektion		1 Stunde nach Injektion von 1 ccm Adrenalin		1 Stunde nach Injektion von 1 ccm Insulin	
10 Minuten	0,0457	10 Minuten	0,0434	10 Minuten	0,0497
15 „	0,0410	15 „	0,0356	15 „	0,0427
20 „	0,0390	20 „	0,0376	20 „	0,0397

Das Bild, das sich aus diesen Kurven ergibt, ist zunächst das, daß auf Injektion von Insulin in jedem Falle die Geschwindigkeitskonstante herabgesetzt wurde, während eine nachfolgende Injektion von Adrenalin diese wieder heraufsetzt, teilweise bis zu einem Werte, welcher dem vor der Insulininjektion entspricht. Andererseits findet auf Adrenalin zunächst ebenfalls eine Abnahme statt, die in dem einen Versuch auf Insulininjektion noch gesteigert wird, während sie im anderen Versuch wieder kompensiert wird. Der Antagonismus Insulin-Adrenalin ist also bei anfänglicher Insulininjektion durchaus ausgeprägt, während

bei umgekehrter Reihenfolge die Verhältnisse vorläufig ganz undurchsichtig sind, da die Versuche sich widersprechen. Direkte Zusammenhänge mit den Blutzuckerwerten bestanden nicht regelmäßig, wenn auch grundsätzlich niedrigeren Blutzuckerwerten ein geringerer Katalasewert entsprach, nicht aber auf Adrenalininjektion die Katalase entsprechend dem höheren Blutzuckergehalt anstieg. Daß Beziehungen bestehen, erscheint trotzdem außerordentlich wahrscheinlich: es wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, die Verhältnisse mehr zu klären.

Eine Reihe weiterer Versuche sollte Klärung über die wiederholt behandelte Frage bringen, inwieweit die Blutkatalase durch Injektionen von Cyankali beeinflußt wird. Daß Zusatz von Blausäure in vitro die Katalase schon in geringsten Mengen schädigt, ist aus einer Reihe von Arbeiten [Literatur s. bei *Morgulis* (5)] ausreichend belegt. Über die Wirkung eingeführter Blausäure auf den Katalasegehalt des Blutes bestehen nur verhältnismäßig wenig Arbeiten. So haben *Battelli* und *Stern* (6) gezeigt, daß bei akuter Blausäurevergiftung, also bei Dosen, welche tödlich wirkten, nach subkutaner Injektion der Katalasegehalt der Gewebe keine Veränderung zeigt. Später haben dann *Duncker* und *Jodlbauer* (7) an Kaninchen zeigen können, daß bei oraler Gabe einer sofort tödlichen Menge (0,1 g pro Kilogramm Tier) der Katalasegehalt des Blutes unverändert war, während bei Dosen, die erst nach ungefähr einer halben Stunde tödlich wirkten, ein Absinken der Katalasemenge stattfand, ohne daß man daraus Schlußfolgerungen auf die physiologische Wirksamkeit bzw. Bedeutung ziehen kann. Ich habe an einer Reihe von Tieren, die entsprechend früheren Erfahrungen nur in längeren Zwischenräumen gebraucht wurden, die Wirksamkeit geringerer Mengen, die zum Teil sehr erheblich unter der tödlichen Dosis lagen, geprüft. Ich gebe nachfolgend die Resultate an zwei Kaninchen:

Vor Injektion		10 Min. nach Injektion		40 Min. nach Injektion		80 Min. nach Injektion	
Injektion von 0,1 mg CNK pro kg.							
10 Min.	0,0470	10 Min.	0,0433	10 Min.	0,0567	10 Min.	0,0444
15 „	0,0470	15 „	0,0432	15 „	0,0502	15 „	0,0403
20 „	0,0436	20 „	0,0411	20 „	0,0469	20 „	0,0359
Injektion von 0,2 mg KCN pro kg.							
10 Min.	0,0489	10 Min.	0,0389	10 Min.	0,0449		
15 „	0,0485	15 „	0,0371	15 „	0,0433	15 Min.	0,0322
20 „	0,0458	20 „	0,0369	20 „	0,0420	20 „	0,0321
Injektion von 0,36 mg pro kg Tier.							
10 Min.	0,0409	10 Min.	0,0427	10 Min.	0,0422	10 Min.	0,0429
15 „	0,0370	15 „	0,0399	15 „	0,0409	15 „	0,0380
20 „	0,0364	20 „	0,0389	20 „	0,0364	20 „	0,0346

Es ergibt sich also der seltsame Zustand, daß vo[illegible]
hier keine Rede sein kann; im Gegenteil wird [illegible]
eine bereits durch Insulin gesetzte Wirksam[illegible]
wie durch Insulin eine durch Adrenalin erz[illegible]
nicht sehr groß, jedoch deutlich einsinnig [illegible]

Die Verhältnisse verändern sich, w[illegible]
größer sind, wenn 1 ccm Insulin = 7 Ei[illegible]
lösung injiziert wurden.

Vor Injektion		1 Stund[illegible] von 1 [illegible]
10 Minuten	0,0507	10 [illegible]
15 „	0,0488	1[illegible]
20 „	0,0481	[illegible]

[illegible] ,0265

[illegible]		[illegible]	
	[illegible]	10 Min.	0,0605
	[illegible]433	15 „	0,0586
	0,0420	20 „	0,0520

Vor Injektion		[illegible]N pro kg Tier.			
10 Minuten	0,040[illegible]	10 Min.	0,0556	10 Min.	0,0489
15 „	0,0[illegible]	15 „	0,0533	15 „	0,0488
20 „	0,[illegible]	20 „	0,0516	20 „	0,0459

von 1 mg KCN pro kg Tier.

Vor Inj[illegible]		[illegible]	
10 Min[illegible]	[illegible]Min. 0,0506	10 Min.	0,0381
15	[illegible] „ 0,0486	15 „	0,0362
20	20 „ 0,0455	20 „	0,0333

[illegible]man in Betracht zieht, daß gewisse Schwankungen der [illegible]werte auch unter sonst nicht erheblich abweichenden Be[illegible]ungen stets vorhanden sind, muß man zunächst den früheren [illegible]toren, vor allem *Duncker* und *Jodlbauer*, darin beistimmen, daß [illegible]entliche Schädigungen der Blutkatalase durch Cyankaliinjektionen bei Kaninchen nicht in Frage kommen, auch wenn, wie in unseren Versuchen, Dosen zur Anwendung kamen, die unter der tödlichen liegen. Als auffallend ist aber doch zu registrieren, daß bei einer bestimmten Menge die Geschwindigkeitskonstante sich außerordentlich wenig ändert, im Gegenteil bemerkenswerterweise konstant bleibt. Das ist besonders bei mittleren Dosen von ungefähr 0,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht der Fall. Eine einigermaßen deutlichere Schädigung ergab sich nur in einem Falle bei Injektion von 1 mg pro Kilogramm, ohne daß ein Ausschlag nach der anderen Seite vorausgegangen wäre. Im übrigen haben sich durchweg Schwankungen ergeben, welche sich nach verschiedenen Seiten hin auswirkten. Besonders bei Injektion kleinster Dosen ergab sich, teilweise nach einer vorübergehenden Abnahme, eine nicht unerhebliche Erhöhung der Katalasewerte, deren

'·ht übersehbaren Bedingungen abhängig zu sein
⁻Fällen verlaufen die Kurven so, daß der Wert
·ssen Zeit wieder erreicht wird, nachdem
·hung der Geschwindigkeitskonstante,
Veränderungen Platz greifen, läßt
nicht angeben. Mit Sicherheit
· Cyanid nur zu sehr geringem
·ntsprechend der nicht un-
ngen auftreten würden.
·dem Cyanwasserstoff
.uch diese Versuche
.ıdungen mit dem Stoff-
.ıon, bestehen. Welcher Art
vorläufig noch vollständig ver-

Literatur.

.tschr. **161**, 71, 1925. — 2) *L. Pincussen* und
.st **168**, 457, 1926. — 3) *J. Horbaczewski*, Sitzber. d.
n.-naturw. Kl. III, 1891, S. 105. — 4) *Trendelenburg*,
Pharm. **2**, 1258. — 5) *S. Morgulis*, Ergebn. d. Physiol.
. — 6) *F. Battelli* und *L. Stern*, Arch. d. Fisiol. **2**, 471, 1905. —
..*er* und *A. Jodlbauer*, diese Zeitschr. **38**, 253, 1911.

Vor Injektion		10 Min. nach Injektion		40 Min. nach Injektion		80 Min. nach Injektion	
			Injektion von 0,5 mg pro kg Tier.				
12 Min.	0,0324	10 Min.	0,0301	10 Min.	0,0343	10 Min.	0,0407
15 „	0,0332	15 „	0,0298	15 „	0,0330	15 „	0,0392
20 „	—	20 „	0,0288	20 „	0,0307	20 „	0,0324
			Injektion von 1 mg KCN pro kg Tier.				
10 Min.	0,0564	10 Min.	0,0516	10 Min.	0,0464	10 Min.	0,0407
15 „	0,0526	15 „	0,0519	15 „	0,0449	15 „	0,0376
20 „	0,0470	20 „	0,0476	20 „	0,0425	20 „	0,0319
			Zweites Kaninchen.				
			Injektion von 0,2 mg KCN pro kg Tier.				
10 Min.	0,0347	10 Min.	0,0500	10 Min.	0,0485	10 Min.	0,0345
15 „	0,0335	15 „	0,0479	15 „	0,0445	15 „	0,0302
20 „	0,0269	20 „	0,0465	20 „	0,0410	20 „	0,0265
			Injektion von 0,4 mg KCN pro kg Tier.				
10 Min.	0,0559	10 Min.	0,0547	10 Min.	0,0449	10 Min.	0,0605
15 „	0,0544	15 „	0,0529	15 „	0,0433	15 „	0,0586
20 „	0,0542	20 „	0,0541	20 „	0,0420	20 „	0,0520
			Injektion von 0,6 mg KCN pro kg Tier.				
10 Min.	0,0498	10 Min.	0,0506	10 Min.	0,0556	10 Min.	0,0489
15 „	0,0474	15 „	0,0494	15 „	0,0533	15 „	0,0488
20 „	0,0479	—	—	20 „	0,0516	20 „	0,0459
			Injektion von 1 mg KCN pro kg Tier.				
		10 Min.	0,0506	10 Min.	0,0381		
13 Min.	0,0349	15 „	0,0486	15 „	0,0362		
20 „	0,0379	20 „	0,0455	20 „	0,0333		

Wenn man in Betracht zieht, daß gewisse Schwankungen der Katalasewerte auch unter sonst nicht erheblich abweichenden Bedingungen stets vorhanden sind, muß man zunächst den früheren Autoren, vor allem *Duncker* und *Jodlbauer*, darin beistimmen, daß wesentliche Schädigungen der Blutkatalase durch Cyankaliinjektionen bei Kaninchen nicht in Frage kommen, auch wenn, wie in unseren Versuchen, Dosen zur Anwendung kamen, die unter der tödlichen liegen. Als auffallend ist aber doch zu registrieren, daß bei einer bestimmten Menge die Geschwindigkeitskonstante sich außerordentlich wenig ändert, im Gegenteil bemerkenswerterweise konstant bleibt. Das ist besonders bei mittleren Dosen von ungefähr 0,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht der Fall. Eine einigermaßen deutlichere Schädigung ergab sich nur in einem Falle bei Injektion von 1 mg pro Kilogramm, ohne daß ein Ausschlag nach der anderen Seite vorausgegangen wäre. Im übrigen haben sich durchweg Schwankungen ergeben, welche sich nach verschiedenen Seiten hin auswirkten. Besonders bei Injektion kleinster Dosen ergab sich, teilweise nach einer vorübergehenden Abnahme, eine nicht unerhebliche Erhöhung der Katalasewerte, deren

Ausmaß von bisher nicht übersehbaren Bedingungen abhängig zu sein scheint. In den meisten Fällen verlaufen die Kurven so, daß der Wert des Anfangs nach einer gewissen Zeit wieder erreicht wird, nachdem Schwankungen, besonders Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante, beobachtet waren. Warum solche Veränderungen Platz greifen, läßt sich vor der Hand auch mutmaßlich nicht angeben. Mit Sicherheit läßt sich wohl sagen, daß das eingespritzte Cyanid nur zu sehr geringem Teil sich im Blute wiederfindet, da sonst, entsprechend der nicht unbeträchtlichen Menge, sehr erhebliche Hemmungen auftreten würden. Wir werden also zu der Ansicht gedrängt, daß dem Cyanwasserstoff irgendwelche indirekte Wirkung zukommt. Auch diese Versuche lassen es wahrscheinlich erscheinen, daß Verbindungen mit dem Stoffwechsel, vielleicht auch der inneren Sekretion, bestehen. Welcher Art diese Beziehungen aber sind, ist uns vorläufig noch vollständig verschlossen.

Literatur.

1) *E. Coelho*, diese Zeitschr. **161**, 71, 1925. — 2) *L. Pincussen* und *F. Seligsohn*, ebendaselbst **168**, 457, 1926. — 3) *J. Horbaczewski*, Sitzber. d. K. Akad. Wien, math.-naturw. Kl. III, 1891, S. 105. — 4) *Trendelenburg*, Handb. d. exper. Pharm. **2**, 1258. — 5) *S. Morgulis*, Ergebn. d. Physiol. **23** I, 308, 1924. — 6) *F. Battelli* und *L. Stern*, Arch. d. Fisiol. **2**, 471, 1905. — 7) *F. Duncker* und *A. Jodlbauer*, diese Zeitschr. **33**, 253, 1911.

Über Veränderungen des Fermentgehalts des Blutes.

III. Mitteilung:

Die Beeinflussung der Katalase durch Strahlung.

Von

Ludwig Pincussen (Berlin).

(Aus dem Schweizerischen Institut für Hochgebirgsphysiologie in Davos.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1925.)

In früheren Arbeiten wurden unter der Einwirkung der Strahlung Resultate gewonnen, welche wahrscheinlich machten, daß diese Umsetzungen im Organismus, ähnlich wie auch im Reagenzglase, wenigstens zum Teil auf gesteigerten Oxydationen beruhten. Ob ein oxydativ wirkendes Zwischenprodukt sich hier einschiebt bzw. welches, ist bisher noch nicht sichergestellt, wenn auch vieles dafür spricht, daß als solches das Wasserstoffsuperoxyd in Frage kommt. Nun ist als Wasserstoffsuperoxyd zersetzendes Ferment die Katalase im Organismus außerordentlich verbreitet. In welcher Weise dieses Ferment in das Geschehen des Organismus eingreift, ist bisher vollständig strittig. Über diese ganze Frage sei auf die zusammenfassende Darstellung von *Morgulis* (1) verwiesen. Ohne auf die schwebenden Fragen vorläufig einzugehen, ist es auf Grund der jetzt zu schildernden Versuche immerhin wahrscheinlich, daß der Katalasegehalt des Blutes zum mindesten irgendwie mit den Stoffwechselvorgängen verknüpft sein muß, und es spricht vieles dafür, daß der Hauptwert der Katalase darin liegt, schädliches, überflüssiges Wasserstoffsuperoxyd zu entfernen.

Die hier zu schildernden Versuche wurden an Kaninchen angestellt. Die Tiere erhielten im allgemeinen Rübennahrung, in Kontrollversuchen, die in meinem hiesigen Laboratorium ausgeführt wurden, Kartoffeln. Die Bestrahlung der Tiere erfolgte in Davos (Anfang März) einfach durch Aussetzen an das helle Tages- bzw. Sonnenlicht, während sie in der übrigen Zeit im Dunkeln gehalten worden waren; in den Berliner Versuchen diente als Lichtquelle eine Quecksilberquarzlampe

von 220 Volt Gleichstrom; in den Zwischenperioden blieben die Tiere im ziemlich dunklen Stalle. Die Versuchsanordnung war im übrigen die gleiche, wie es in der vorhergehenden zweiten Mitteilung dieser Serie bzw. in „Fermente und Licht VIII" geschildert worden ist. Das Blut wurde in gewöhnlicher Weise aus der Ohrvene entnommen und auf eine ganz gleichmäßige Folge der Manipulationen besonderer Wert gelegt. Es ist selbstverständlich, daß stets die gleiche Blutpipette verwendet wurde: auch die H_2O_2-Konzentration und das p_H blieben gleich. Die Reaktionslösung war gemischt aus 100 ccm H_2O_2-Lösung und 15 ccm m/3 Phosphat; die Temperatur des Fermentversuchs 20⁰. Zur Titration mit n/100 Permanganat wurden stets 25 ccm angewandt.

In nachfolgenden Tabellen sind angegeben: 1. die in den verschiedenen Zeiten verbrauchten Permanganatmengen und 2. die nach der monomolekularen Reaktionsformel berechnete Geschwindigkeitskonstante. Wie bei fast allen Katalaseversuchen fallen, trotz verhältnismäßig günstiger Wahl des Mischungsverhältnisses, die Geschwindigkeitskonstanten nicht ganz gleichmäßig aus, sondern fallen in der Regel leicht ab.

Versuch I (Davos).

Kaninchen im Dunkeln gehalten (a) und nach Belichtung von morgens 10 Uhr bis nachmittags 4 Uhr bei hellem Wetter, zum Teil Sonne (b).

Versuch a.			Versuch b.		
Zeit Minuten	Permanganat ccm	k	Zeit Minuten	Permanganat ccm	k
0	27,5	—	0	27,0	—
6	14,1	0,1110	6	14,9	0,1002
12	7,5	0,1030	12	8,4	0,0975
20	4,0	0,0968	20	4,4	0,0902

Die Blutentnahme zur zweiten Katalasebestimmung erfolgte innerhalb 10 Minuten nach beendeter Belichtung.

Versuch II (Davos).

Weißschwarzes Kaninchen, im Dunkeln gehalten (a), nach subkutaner Injektion von 2 ccm einer 2 proz. Lösung von Erythrosin, von 10 Uhr bis 4½ Uhr hellem Tageslicht ausgesetzt (b).

Versuch a.			Versuch b.		
Zeit Minuten	Permanganat ccm	k	Zeit Minuten	Permanganat ccm	k
0	27,6	—	0	28,5	—
8	11,2	0,112	6	17,0	0,087
14	6,9	0,099	13	9,0	0,087
20	4,8	0,087	20	5,6	0,083

Es ergibt sich also in beiden Versuchen, sowohl mit wie ohne Zusatz eines Sensibilisators, eine nicht erhebliche, aber doch deutliche Verringerung der Katalasewirkung durch die Strahlung.

Diese Differenz wird noch deutlicher bei hellem Licht, besonders Sonnenlicht, wie Versuch III, bei dem auch eine größere Menge Sensibilisator angewendet wurde, zeigt.

Versuch III (Davos).

Weißschwarzes Kaninchen, a) im Dunkeln, b) nach Injektion von 4 ccm Erythrosinlösung, 2proz., am Licht von 9½ bis 3½ Uhr, darunter Sonne über die Hälfte der Zeit.

Versuch a.			Versuch b.		
Zeit Minuten	Permanganat ccm	k	Zeit Minuten	Permanganat ccm	k
0	28,1	—	0	29,8	—
6	15,3	0,1010	6	20,0	0,0667
12	9,5	0,0905	12	14,0	0,0630
20	5,3	0,0834	20	9,3	0,0582

Frühere Versuche, welche einen erheblichen Einfluß von Jodkali auf die Lichtwirkung im Stoffwechsel ergeben hatten, legten die Frage nahe, ob auch die Katalase sich entsprechend dem besonders am Stickstoff beobachteten erhöhten Umsatz verändert. Diese Stoffwechseländerung ist, wie an früherer Stelle (2) ausgeführt worden ist, verknüpft mit einer erhöhten Abspaltung von Jod durch das Licht; das intermediär gebildete Jod dürfte der Vermittler der erhöhten Oxydation sein. Die Versuche geben in diesem Falle kein eindeutiges Resultat. In einer Reihe von Versuchen wurde eine Veränderung der Katalase nach Jodkaligaben und Belichtung kaum beobachtet, während in anderen eine deutliche Abnahme der Katalase gefunden wurde. Nachfolgend Versuch IV.

Versuch IV.

a) Unbehandeltes Kaninchen, b) nach oraler Gabe von 10 ccm 2proz. Jodkalilösung, von 11 bis 5 Uhr nachmittags im hellen Licht, ungefähr ein Viertel der Zeit Sonne.

Versuch a.			Versuch b.		
Zeit Minuten	Permanganat ccm	k	Zeit Minuten	Permanganat ccm	k
0	27,3	—	0	28,1	—
9	9,8	0,113	6	15,3	0,101
14	6,4	0,104	13	9,5	0,078
20	4,0	0,096	20	6,0	0,077

Die in Berlin ausgeführten Versuche sind grundsätzlich den in Davos gemachten gleich.

Versuch V.

Graues Kaninchen, a) unbestrahlt, b) 12 Minuten mit Quarzlampe bestrahlt in 100 cm Abstand. Prüfung sofort nach dem Versuch.

Versuch a.			Versuch b.		
Zeit Minuten	Permanganat ccm	k	Zeit Minuten	Permanganat ccm	k
0	20,6	—	0	21,6	—
4	15,2	0,0807	5	16,6	0,0520
8	10,7	0,0680	10	13,4	0,0473
20	6,2	0,0621	20	9,5	0,0410

In weiteren Versuchen wurde die Katalasespaltung zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung untersucht.

Versuch VI.

Weißes Kaninchen, 12 Minuten in 90 cm Abstand durch Quarzlampe (220 Volt) bestrahlt.

Zeit Minuten	Permanganat ccm	k	Zeit Minuten	Permanganat ccm	k
Vor Bestrahlung.			60 Minuten nach Bestrahlung.		
0	22,6	—	0	22,6	—
6	14,2	0,0775	9	12,4	0,0672
13	8,6	0,0750	14	8,6	0,0687
20	5,5	0,0720	20	7,4	0,0555
25 Minuten nach Bestrahlung.			120 Minuten nach Bestrahlung.		
0	22,6	—	0	21,8	—
7	14,0	0,0685	5	15,6	0,0665
12	10,8	0,0615	12	11,2	0,0555
20	7,0	0,0584	20	7,8	0,0513

In diesen beiden Versuchen zeigt sich also ebenfalls eine Abnahme der Katalase, die nach 2 Stunden nicht nur nicht abgeklungen ist, sondern sogar noch ein wenig verstärkt erscheint.

Besonders starke Einwirkung ergab sich in einem Versuch, in welchem ein schwarzweißes Kaninchen nach Injektion von 2 ccm Jodkalilösung und 2 ccm einer 1 proz. Eosinlösung 15 Minuten lang in einer Entfernung von 90 cm bestrahlt wurde. Der Einfluß war hier sehr deutlich und nach 2 Stunden noch erheblich gesteigert.

Versuch VII.

Vor Bestrahlung.			10 Minuten nach Bestrahlung.		
Zeit Minuten	Permanganat ccm	k	Zeit Minuten	Permanganat ccm	k
0	23,0	—	0	23,0	—
5	17,4	0,0588	5	19,0	0,0382
10	13,8	0,0520	12	14,5	0,0383
15	10,6	0,0470	20	12,4	0,0310
120 Minuten nach Bestrahlung.					
0	23,0	—	14	16,6	0,0234
8	18,8	0,0252	20	14,6	0,0227

Hier ist also die Katalaseabnahme unter Jodkali außerordentlich erheblich. Durch Eosin wird bekanntlich unter Licht die Jodabspaltung wesentlich gesteigert, so daß wir wohl annehmen müssen, daß das Wesentliche nicht der Sensibilisator ist, sondern die durch seine Zugabe erhöhte Abspaltung des Jods. Das hier gewonnene Bild entspricht den früheren Stoffwechselversuchen besser als das in Versuch IV. Ob zwischen diesen Berliner und den Davoser Versuchen in bezug auf die Katalasemenge graduelle oder prinzipielle Unterschiede bestehen, muß vorläufig dahingestellt bleiben.

Schließlich soll noch ein Versuch am Menschen kurz erwähnt werden, der erstmalig eine 6 Minuten dauernde Bestrahlung durch eine Quarzlampe auf Brust und Rücken in je 1 m Abstand erhielt. Die berechneten Konstanten waren die folgenden.

Versuch VIII.

Vor Bestrahlung		10 Minuten nach Bestrahlung		60 Minuten nach Bestrahlung	
k_{10}	0,1301	k_{10}	0,1207	k_{11}	0,1111
k_{15}	0,1257	k_{15}	0,1207	k_{16}	0,1093
k_{20}	0,1160	k_{20}	0,1133	k_{20}	0,1058

Also auch hier ist eine Abnahme zu konstatieren.

Alle Versuche, wenn wir von einigen Versuchen mit Jodkali absehen — es ist aus Raumersparnis eine größere Reihe von Protokollen fortgeblieben —, ergeben eine deutliche Abnahme der Katalase nach Belichtung. Da die Parallelversuche an demselben Orte angestellt worden sind, kommen wohl Veränderungen des Luftdrucks sicherlich nicht, zum mindesten nicht als einziger Faktor in Frage. Die Abnahme der Katalasewirkung erfolgt sowohl im Tiefland wie im Höhenklima, und soweit die Versuche vorläufig einen Überblick gestatten, ist der Grad der Katalaseabschwächung hier und dort ungefähr der gleiche. Es scheint also danach, daß das Ausschlaggebende das Licht und die damit verknüpften Stoffwechselprozesse sind. Inwieweit das Höhenklima einen Einfluß hat, kann erst dann gesagt werden, wenn an denselben Tieren in der Tiefe und auf der Höhe vergleichende Untersuchungen unter im übrigen ganz identischen Bedingungen angestellt sind. Dies soll gelegentlich nachgeholt werden.

Wie schon anfangs erwähnt, besteht vorläufig nicht die Absicht, über die Grundlage dieser Katalaseveränderung ein Urteil zu fällen. *Viale* (3) hat in seinen Versuchen eine Steigerung der Katalase in der Höhe gefunden. Seine Erklärung dieser Erscheinung ist eine teleologische. Eine solche könnte man, wenn auch in anderem Sinne als *Viale*, auch für die von mir beobachteten Erscheinungen anführen. Man könnte sagen, daß für die gesteigerten Oxydationen so viel Wasserstoffsuperoxyd — wenn wir dieses als den Vermittler der Oxydations-

tätigkeit im Licht ansehen — verbraucht wird, daß für die Zersetzung des überschüssig gebildeten H_2O_2 nun eine geringere Katalasemenge im Blute erforderlich ist, indem von dem gebildeten H_2O_2 verhältnismäßig nur geringe Mengen im Blute vorhanden sein dürften. Das ist natürlich keine präzise Erklärung, insbesondere sagt es nichts darüber aus, auf welche Weise diese Regulation der Katalasewirkung erfolgen könnte. Vielleicht ist es doch ein Weg zum Verständnis dieser bisher so rätselhaften Fermentwirkung.

Anhangsweise sollen noch einige Versuche mitgeteilt werden, welche über die Wirkung des Adrenalins und des Pilocarpins in Davos angestellt worden sind. Wie aus der zweiten Mitteilung dieser Serie hervorgeht, bestand die Wirkung des Adrenalins in größeren Dosen in einer Verminderung der katalatischen Wirkung des Blutes, die des Pilocarpins in einer Besserung. Die in Davos an Kaninchen ausgeführten Versuche ergeben, daß grundsätzlich die erzielte Wirkung gleichsinnig war. Es sei bemerkt, daß bei diesen Versuchen die Tiere nach der Injektion ebenfalls im Licht gehalten wurden.

Versuch IX.

Kaninchen, weißschwarz, etwa 1500 g, a) vor Injektion, b) 1 Stunde nach Injektion von 1 ccm Adrenalin 1 : 1000.

Versuch a.			Versuch b.		
Zeit Minuten	Permanganat ccm	k	Zeit Minuten	Permanganat ccm	k
0	28,4	—	0	29,0	—
6	16,4	0,092	6	17,0	0,089
12	10,5	0,083	12	11,3	0,078
20	6,1	0,077	20	7,4	0,069

Versuch X.

Kaninchen, braunweiß, etwa 1400 g, a) vor Injektion, b) ½ Stunde nach Injektion von 1 ccm Pilocarpinlösung 1 : 100. Kaninchen zeigt leichte Lähmungserscheinungen nach der Injektion, streckt Beine von sich, krampfartige Symptome und erschwerte Atmung. Der Versuch ergibt eine deutliche Zunahme der Katalasewirkung. Ob sie mit diesen Symptomen, die mindestens zum Teil auf eine schlechte Sauerstoffversorgung hindeuten, zu tun hat, bleibe dahingestellt, da eine Vermehrung ja auch bei den in der zweiten Abhandlung geschilderten Versuchen im Tiefland beobachtet wurde, ohne daß ähnliche Erscheinungen auftraten.

Versuch a.			Versuch b.		
Zeit Minuten	Permanganat ccm	k	Zeit Minuten	Permanganat ccm	k
0	28,4	—	0	29,2	—
6	14,2	0,115	6	12,6	0,140
12	7,6	0,110	12	5,0	0,145
20	2,8	0,115	20	2,0	0,135

Es ist früher bereits darauf hingewiesen worden, daß die verschiedenen Tiere durchaus nicht gleichmäßig reagieren. Wenn also in diesen Versuchen die Ausschläge z. T. geringer erscheinen als die a. a. O. mitgeteilten, so ist daraus nicht ohne weiteres zu schließen, daß im Hochgebirge die Reaktionen in schwächerem Maße ablaufen als im Tiefland. Es ist immerhin aber an die Möglichkeit zu denken; weitere Versuche wären erforderlich, um hierüber Klarheit zu schaffen, am besten Versuche am gleichen Tiere und bei gleicher Ernährung im Tiefen- und Höhenklima. Vor allem wird auch noch zu prüfen sein, ob bei verschiedener Nahrung Divergenzen auftreten, wie sie gegenüber dem Adrenalin bei Ernährung mit Rübenfutter einerseits, Haferfutter andererseits beobachtet (vgl. Mitteilung II) wurden. Sicher scheint zu sein, daß im Höhenklima diese Reaktionen auf sympathische bzw. parasympathische Pharmaca gleichsinnig wie im Tiefland verlaufen. Es war geplant, die Verhältnisse in Davos vergleichend mit denen in dem 900 m höher gelegenen Laboratorium des Forschungsinstituts in Muottas Muraigl zu prüfen. Leider gelang der Versuch nicht, weil es dort unmöglich war, von den mit Adrenalin injizierten und darauf der Strahlung ausgesetzten Tieren Blut zu bekommen. Die additive Wirkung des Adrenalins und der trotz der starken Strahlung niedrigen Lufttemperatur — im Schatten betrug diese minus 18^0 — hatte die Gefäße des Ohres derartig zusammengezogen, daß auch durch tiefe Einschnitte die Gewinnung auch nur eines Tropfens Blut zur Unmöglichkeit wurde. Die allgemeine Schädigung der Tiere war so groß, daß das eine noch in der oberen Station ungefähr 2 Stunden nach der Injektion starb, während das andere am Abend noch lebend nach Davos gebracht werden konnte, wo es dann in der Nacht erlag.

Literatur.

1) *S. Morgulis*, Die Katalase. Ergebn. d. Physiol. (*Asher-Spiro*) **23**, 1, 1924. — 2) *L. Pincussen*, diese Zeitschr. **150**, 36, 1924. — 3) *G. Viale*, Atti R. accad. naz. dei Lincei rend. **33**, 290, 1924.

Autorenverzeichnis.